



# **INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ**

## **MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA**

### **NOVAS FORMAS DE CARACTERIZAÇÃO DO MICROBIOMA ORAL**

Trabalho submetido por  
**Catarina Samuel Mascote**  
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

**novembro de 2017**





# **INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ**

## **MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA**

### **NOVAS FORMAS DE CARACTERIZAÇÃO DO MICROBIOMA ORAL**

Trabalho submetido por  
**Catarina Samuel Mascote**  
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Trabalho orientado por  
**Professor Doutor Nuno Taveira**

**novembro de 2017**



## **AGRADECIMENTOS**

Em primeiro lugar não posso deixar de agradecer aos meus pais pela oportunidade que me deram, assim como todo apoio e esforço realizado para que eu pudesse alcançar todos os meus objetivos.

À minha irmã, por ter sempre torcido por mim e por me ter dado a melhor sobrinha do mundo.

A toda a minha família por me ter sempre apoiado e acreditado em mim, em especial à minha tia-avó Conceição, que cuidou de mim desde que nasci e que, infelizmente já não se encontra entre nós.

Ao Professor Doutor Nuno Taveira, pela paciência, disponibilidade e todo o seu trabalho como meu orientador.

Ao meu namorado João agradeço todo o apoio que me deu. Por ter sempre uma palavra amiga, por todo o carinho, amor e ajuda nas alturas que mais precisava.

Às minhas amigas, Margarida e Flávia com quem vivi muitos momentos durante estes anos e sempre me apoiaram nas boas e más alturas.

Finalmente, a todos aqueles que partilharam comigo esta jornada e que de uma maneira ou de outra enriqueceram este processo, tornando-o um período que não vou esquecer.



## RESUMO

O presente trabalho é uma revisão dos constituintes do micobioma oral em indivíduos saudáveis e doentes à luz das novas técnicas genómicas e metagenómicas disponíveis para identificar e caracterizar os fungos. Em relação aos indivíduos doentes a revisão centrou-se em pacientes com doenças sistémicas e com fatores predisponentes para a ocorrência de infeções da cavidade oral. Estes são alguns dos grupos de indivíduos que muitas vezes comparecem na consulta de Medicina Dentária e é importante para o Médico Dentista manter-se actualizado nesta área em constante evolução de modo a que possa agir eficazmente ao nível do diagnóstico, terapêutica e prevenção das doenças orais causadas por fungos.

Foi efectuada uma pesquisa na PubMed com as palavras-chave “*Oral mycobiome*” (24 resultados) e “*oral*” “*funga*” “*microbiota*” (43 resultados). Foram seleccionados 18 artigos de acordo com objectivos do trabalho assim como bibliografia citada neles. Deu-se preferência aos artigos com menos de cinco anos.

Embora os métodos de cultura ainda continuem a ser utilizados rotineiramente no laboratório de Microbiologia, os métodos moleculares têm vindo a ganhar terreno à medida que se tornam mais rápidos e precisos. Com estes descobriu-se que o micobioma oral em indivíduos saudáveis é constituído por cerca de 74 géneros cultiváveis e 11 não cultiváveis, num total de 101 espécies, sendo *Candida*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Cryptococcus*, *Cladosporium*, *Aureobasidium*, *Sacharomicetales* os géneros mais frequentemente identificados da cavidade oral. Em indivíduos com doenças como a diabetes *mellitus* e infecção por VIH o micobioma oral difere do dos saudáveis, nos géneros e espécies identificadas e na sua abundância.

Muitos destes fungos já tinham sido identificados anteriormente por estudos baseados na cultura, no entanto com estas novas técnicas foram descobertos constituintes do micobioma oral que até à data ainda não se tinha conseguido identificar.

**Palavras-chave:** Micobioma oral; Saúde; Doença; Métodos.





## ABSTRAT

This thesis aims to revise the components of the oral mycobiome in health and disease, according to the available genomic and metagenomic techniques.

This review focused on patients with systemic diseases and with some predisposing factors to infections of the oral cavity. This are some of the groups that show up regularly at the Dentist's office, so we should know and be updated in this constant evolving area so we can act efficiently in the diagnostic, terapeutic and prevention of oral diseases caused by fungi.

A search was performed in PubMed with the keywords "Oral mycobiome" (24 results) and "oral" "fungal" "microbiota" (43 results). It was selected 18 articles according to the objectives of the work as well as the bibliography cited in them. Preference was given to articles under five years.

Although culture methods are still routinely used in the Microbiology laboratory, molecular methods are gaining ground as they become faster and more accurate. With molecular techniques it was discovered that oral mycobiome in healthy individuals consists of about 74 cultivable, 11 non-cultivable genera with a total of 101 species, being *Candida*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Cryptococcus*, *Cladosporium*, *Aureobasidium*, *Sacharomicetales* the most genera often identified from the oral cavity. In individuals with diseases such as diabetes mellitus and HIV infection, the oral mycobiome differs from the healthy, in the genera and species identified and its abundance.

Many of these fungi had previously been identified by culture-based studies, however with these new techniques it was discovered components of the oral mycobiome that had not yet been identified.

**Keywords:** Oral mycobiome; Health; Disease; Methods.



## ÍNDICE GERAL

Índice de Figuras.....	7
Índice de Tabelas.....	9
Lista de Siglas.....	11
Glossário.....	13
1 Introdução.....	15
2 Métodos de identificação dependentes da cultura.....	19
2.1 Estudo do género <i>Candida</i> e outras leveduras .....	19
2.1.1 Meios de cultura cromogêneos .....	20
2.1.2 Meio de cultura Fluorogênicos .....	20
2.1.3 Testes complementares de identificação de leveduras .....	22
2.2 Estudo dos géneros <i>Aspergillus</i> e <i>Penicillium</i> .....	24
2.3 Problemas com a utilização de métodos morfológicos para a identificação de fungos .....	25
3 Métodos moleculares de identificação de fungos orais independentes da Cultura .	27
3.1 Reação da polimerase em cadeia (PCR) .....	28
3.2 PCR quantitativo em tempo real .....	29
3.3 <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> (RFLP) de produtos de PCR (PCR- RFLP) .....	30
3.4 Heterogeneidade de comprimento dos produtos de PCR ( <i>Length Heterogeneity PCR</i> /PCR- LH) .....	31
3.5 PCR- Multiplex.....	31
4 identificação de fungos por Sequenciação do ADN.....	33
5 Métodos e Plataformas de Sequenciação .....	35
5.1 Sequenciação de 1 <sup>a</sup> Geração .....	35
5.1.1 Sequenciação com terminadores de cadeia .....	35
5.2 Sequenciação de 2 <sup>a</sup> Geração .....	36
5.2.1 Pirosequenciação (Plataforma 454 GS- FLX Roche).....	37
5.2.2 Plataforma Illumina .....	38
5.2.3 Plataforma SOLiD .....	40
5.2.4 Plataforma Ion Torrent .....	41
5.3 Estratégias de identificação de fungos com base nas sequências de ADN.....	44

5.3.1	ADN <i>Barcoding</i> .....	44
5.3.2	Análise filogenética .....	48
5.3.3	MTPS – <i>Multitag Pyrosequencing</i> .....	48
6	Diversidade da Micobiota Oral com base em métodos moleculares .....	49
6.1	Micobioma Oral em indivíduos saudáveis.....	49
6.2	Micobioma oral em indivíduos idosos.....	56
7	Micobioma Oral em algumas doenças com base em métodos moleculares .....	59
7.1	Micobioma oral em pacientes com VIH e SIDA .....	59
7.2	Micobioma oral em pacientes com Diabetes mellitus .....	62
7.3	Micobioma na candidíase oral .....	64
8	Conclusão .....	69
9	Bibliografia.....	71

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Tubos germinativos presentes em <i>Candida albicans</i> [retirado de Williams & Lewis (2000)]. .....	22
<b>Figura 2</b> - Quadro de Leitura da galeria API Candida (retirado do fabricante, Biomérieux, França). .....	24
<b>Figura 3</b> – Métodos de identificação de fungos mais utilizados entre 2000 e 2016.....	26
<b>Figura 4</b> - Fluxograma operacional explicativo das etapas a realizar nos métodos moleculares de sequenciação de Nova Geração. Adaptado de Thermo Fisher Scientific, disponível em <a href="https://www.thermofisher.com/us/en/home/life-science/sequencing/next-generation-sequencing.html">https://www.thermofisher.com/us/en/home/life-science/sequencing/next-generation-sequencing.html</a> . .....	34
<b>Figura 5</b> - Estrutura química de um Didesoxinucleótido (ddNTP) e de um Desoxinucleótido (dNTP). Retirado de Leandro M. Moreira (2016). .....	35
<b>Figura 6</b> – Esquema da sequenciação com inibidores terminadores de cadeia. Usam-se baixas concentrações de ddNTPs e altas concentrações de dNTPs. Retirado de Leandro M. Moreira (2016). .....	36
<b>Figura 7</b> – Esquema do processo de Pirosequenciação. Adaptado de Siqueira et al., (2012). .....	37
<b>Figura 8</b> – Etapas da sequenciação da plataforma Illumina (retirado do fabricante Illumina Inc, EUA). .....	39
<b>Figura 9</b> – Etapas da sequenciação utilizada na Plataforma SOLiD. Adaptado de Moreira et al., (2015). .....	40
<b>Figura 10</b> – Arquitetura do <i>chip</i> por onde escoam as esferas durante a sequenciação com Ion Torrent. Retirado de ThermoFisher, EUA. ....	41
<b>Figura 11</b> – Representação simplificada de um poço contendo uma esfera ligada ao fragmento de ADN. Por baixo (a cinzento) observa-se o sensor que identifica a mudança de pH. Retirado de Rothberg <i>et al.</i> (2011). ....	41
<b>Figura 12</b> – Fluxograma do processo de <i>barcoding</i> do ADN. Adaptado de Purty & Chatterjee (2016). .....	44
<b>Figura 13</b> – Ilustração das regiões 18S, ITS1-5.8S- ITS2 e 28S. Adaptado de Cui <i>et al.</i> , (2013). ....	46
<b>Figura 14</b> - Distribuição dos fungos na cavidade oral de 20 indivíduos. (Retirado de Ghannoum <i>et al.</i> (2010). No eixo do Y, encontra-se a frequência (%) para cada amostra	

(eixo do X). A1, A2, A3, B1, B2, B3, C1, C2,C3, D1, D2, E1, E2,E3, F1, F2, G1, G2, G3 e H2, correspondem à identificação de cada amostra..... 51

**Figura 15** - Frequência dos géneros de fungos presentes em  $\geq 20\%$  das amostras testadas de lavado oral de indivíduos saudáveis no estudo de Ghannoum *et al.*, (2010). No eixo do X, estão descritos os géneros dos fungos identificados nas amostras. No eixo do Y, a frequência (%) dos mesmos. .... 52

**Figura 16** – Diagrama de Venn das relações entre os dois estudos do microbioma oral de Ghannoum *et al.* (2010) (direita) e Dupuy *et al.* (2014) (esquerda). Existe uma sobreposição entre os dois estudos (a roxo, ao centro). Os géneros *Epicoccum*, *Phoma* e *Sacharomyces* foram encontrados em ambos os estudos, no entanto não foram considerados como partilhados, devido aos limites de cada estudo. Retirado de Dupuy *et al.* (2014). .... 53

**Figura 17** - Diagrama de Venn que ilustra os géneros de fungos identificados como constituintes do microbioma oral por métodos baseados na cultura (direita) e em métodos de sequenciação da região ITS (esquerda). Ao centro (sobreposição) encontram-se os géneros identificados com ambos os estudos. Adaptado de Diaz *et al.*, (2016). .... 55

**Figura 18** - Microbioma fúngico de pacientes VIH<sup>+</sup> e VIH<sup>-</sup> no estudo de Mukherjee *et al.*, (2014). .... 61

**Figura 19** - Fungos presentes no microbioma oral de indivíduos infectados (esquerda) e não infectados (direita) com VIH. Na interseção dos dois círculos são representados os fungos encontrados em ambos os indivíduos. Adaptado de Mukherjee *et al.*, (2014)... 62

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Resultados da cultura de <i>Candida spp.</i> em diferentes meios cromogénicos..	21
<b>Tabela 2</b> - Descrição das vantagens e desvantagens correspondentes a cada método utilizado para caracterizar o micobioma	43
<b>Tabela 3</b> - Propriedades (química, comprimento em pb e tempo de processamento) dos sequenciadores de alto rendimento (Di Bella et al., 2013).	44
<b>Tabela 4</b> - Bases de dados para identificação das espécies fúngicas. Adaptado de (Raja et al., 2017).	47
<b>Tabela 5</b> – Géneros dos fungos presentes na cavidade oral nas amostras de lavado oral dos 20 indivíduos saudáveis. Adaptado de Ghannoum <i>et al.</i> , (2010).	50
<b>Tabela 6</b> – Frequência dos géneros encontrados em pelo menos 50% dos indivíduos estudados em Dupuy <i>et al.</i> (2014).	54
<b>Tabela 7</b> – Espécies fúngicas identificadas por PCR-LH no estudo de Zakaria <i>et al.</i> (2017).	57
<b>Tabela 8</b> - Associação entre os fatores relacionados com estado de saúde com a carga fúngica a nível oral. Adaptado de Zakaria <i>et al.</i> (2017).	58
<b>Tabela 9</b> – Fungos presentes na cavidade oral de pacientes com VIH Adaptado de Aas <i>et al.</i> (2007).	60
<b>Tabela 10</b> – Comparação dos resultados dos pacientes diabéticos com os não diabéticos. Adaptado de Manfredi <i>et al.</i> (2002)	63
<b>Tabela 11</b> – Espécies de fúngicas detectadas em pacientes com candidíase pseudomembranosa no estudo de Ieda <i>et al.</i> (2014).	66
<b>Tabela 12</b> - Espécies fúngicas identificadas nas amostras de lavado oral de pacientes com Candidíase Pseudomembranosa no estudo de Imabayashi <i>et al.</i> , (2016).	68





## **LISTA DE SIGLAS**

<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>SDA</b>	Agar Sabouraud Dextrose
<b>GTT</b>	Germ-Tube Test
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction
<b>ddNTP</b>	didesoxinucleotido
<b>dNTP</b>	Desoxinucleótido trifosfatado
<b>PPi</b>	Pirofosfato
<b>pb</b>	Pares de base
<b>RFLP</b>	Restriction Fragment Length Polymorphism
<b>MTPS</b>	Multitag Pyrosequencing
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>ARNr</b>	ARN ribossomal
<b>ITS</b>	Internal Transcribed Spacer
<b>rADN</b>	ADN ribossomal
<b>CPM</b>	Candidíase Pseudomembranosa
<b>LH-PCR</b>	Length Heterogeneity PCR



## **GLOSSÁRIO**

Micobioma: Conjunto de fungos de um organismo.

Genómica microbiana: caracterização e quantificação dos microrganismos com base no seu genoma. Inclui a sequenciação de ADN genómico e a análise de sequências para identificar genes, e comparação com sequências genómicas de outros organismos.

Metagenómica: Metagenoma é o nome dado ao genoma da microbiota encontrada num determinado local. Assim a Metagenómica é a análise genómica dos microorganismos de uma amostra biológica. Pretende caracterizar os microorganismos numa comunidade microbiana com base na análise do seu genoma.



## 1 INTRODUÇÃO

O microbioma oral do Homem inclui todas as espécies de fungos encontradas na cavidade oral (Gouba & Drancourt, 2015), sendo uma das mais complexas e diversificadas comunidades no nosso organismo (Monteiro-da-Silva, Araujo, & Sampaio-Maia, 2014). O microbioma é diferente consoante o hospedeiro, local do organismo e entre indivíduos (Dworecka-kaszak, Dąbrowska, & Kaszak, 2016).

A cavidade oral é um ecossistema complexo que muda ao longo do tempo e acolhe vários microorganismos. Antes do nascimento é um meio estéril. Durante o nascimento, aquando da passagem pelo canal de parto, a cavidade oral é colonizada por microorganismos provenientes da progenitora e posteriormente por diversas espécies ao longo do tempo (Krom, Kidwai, & Cate, 2014). Embora a transmissão para o recém-nascido da microbiota da progenitora ainda não se encontre bem documentada, pensa-se que o microbioma Humano deriva da microbiota vaginal da mãe (Dworecka-kaszak et al., 2016).

A ecologia oral é diversa, albergando um largo número de diferentes espécies microbianas, existindo mais de 500 espécies distintas. Destas, 75% são encontradas em elevadas proporções em pessoas saudáveis e constituem o núcleo da microbiota oral residente (Krom et al., 2014). A diversidade na cavidade oral é uma das mais elevadas de todos os habitats do organismo humano, provavelmente, por existirem dois tipos de superfícies: superfícies lisas/moles da mucosa (língua, palato e mucosa jugal) e superfícies duras (dentes). Os vários locais da cavidade oral têm cada um o seu nível de condições ambientais, no que toca à disponibilidade de nutrientes e oxigénio, existindo assim uma “paisagem” ecológica diversa. Certos microorganismos são seleccionados para crescer e colonizar em determinadas superfícies ou nichos, consoante as condições de nutrientes e oxigénio disponíveis neles (Krom et al., 2014).

Os fungos são organismos ubiqüitários que colonizam tanto humanos como os outros animais e plantas e alguns fungos habitam o organismo humano sem qualquer efeito prejudicial para o mesmo (Monteiro-da-Silva et al., 2014). Os fungos têm ainda a capacidade de interagir com numerosas espécies de bactérias orais (Krom et al., 2014).

Comparando com as plantas e animais, os fungos são muitas vezes considerados organismos simples, no entanto exibem uma grande diversidade na sua morfologia,

ecologia e ciclos de vida. As variações na sua forma, tamanho e cultivabilidade trazem desafios ao estudo da diversidade do micobioma (Xu, 2016).

As células fúngicas são revestidas por uma parede celular, que contém no seu interior, a membrana plasmática, o citoplasma e os organelos encontrados em todas as células eucarióticas. O seu polissacarídeo de reserva é o glicogénio e o lípido estrutural de membrana é o ergosterol. Embora possuam parede celular, estes eucariotas têm maior semelhança com as células animais do que com as células bacterianas. O seu núcleo é organizado e possuem cromossomas com ADN de dupla cadeia e nucléolo. Possuem mitocôndria, complexo de Golgi, vacúolos e grânulos de glicogénio. Possuem ribossomas 80S tal como as células animais. O esterol da membrana citoplasmática é o ergosterol, ao contrário do que existe nas células animais, que é o colesterol (Souto, Duarte, & Brandi, 2011). A parede celular é rígida e é composta por três camadas. A primeira camada (a mais externa) é constituída por manoproteínas, a camada intermédia é constituída por uma rede de glucanos ( $\beta$ -(1,3)-glucano e  $\beta$ -(1,6)-glucano), e a camada interna é constituída por quitina. Os fungos podem ter uma estrutura leveduriforme (unicelular) ou filamentosa (multicelular) e alguns podem possuir as duas formas durante o seu ciclo de vida - os fungos dimórficos (Gonçalves, 2014).

Os fungos podem ser comensais ou patogénicos (Suhr, 2015) e podem reproduzir-se sexuada e/ou assexuadamente (Xu, 2016). Quando o fungo se reproduz de forma assexuada envolve apenas o processo mitótico; quando se reproduz sexuadamente, ocorre a formação de esporos por meiose, depois da formação de um zigoto resultante da fusão de dois núcleos de sexos opostos. Quando apresenta uma fase sexuada de reprodução é designado por teleomorfo; quando não apresenta fase sexuada de reprodução designa-se por anamorfo. Muitas vezes a identificação de fungos patogénicos faz-se através da morfologia das estruturas envolvidas na reprodução assexuada, que permite diferenciar os géneros e as espécies (Gonçalves, 2014).

As limitações dos métodos cultura-dependentes para os estudos do micobioma levaram à introdução de abordagens independentes da cultura. Com estas novas técnicas, procedeu-se a uma expansão do conhecimento dos micobiomas encontrados nas diversas partes do organismo do Homem e suas associações com algumas doenças (Cui, Morris, & Ghedin, 2013).

Com os métodos de cultura “tradicionais” ou PCR especificamente direccionados para a identificação de alguns fungos, havia a percepção de que os fungos da cavidade oral e de outros locais do Homem estariam apenas limitados a algumas

espécies. A utilização de técnicas genómicas e metagenómicas independentes da cultura permitiu verificar que o micobioma oral dos indivíduos saudáveis é na realidade, constituído por um maior número de géneros e espécies de fungos do que se pensava (Ghannoum et al., 2010). De uma forma geral as tecnologias *omics*, onde se incluem em particular a metagenómica, têm vindo a permitir obter um conhecimento mais completo e profundo, a nível qualitativo e quantitativo do microbioma humano (Dworecka-kaszak et al., 2016; Kutikhin & Yuzhalin, 2015; Tlaskalová-Hogenová et al., 2011).

Um dos grandes desafios no que toca à pesquisa ao nível do micobioma é a sua nomenclatura. Ao contrário do que acontece quando se refere a outros organismos, um fungo pode ter vários nomes, que podem refletir a sua morfologia sexual/assexual, ou descoberta com significado histórico ou geográfico. Mais recentemente um dos grandes objetivos tem sido minimizar a confusão que existe ao nível da nomenclatura, incluindo a iniciativa de colocar “um nome para cada fungo” ou “*one name one fungus – INIF*”. Existem grupos de estudo internacionais que estão a trabalhar ao nível de criar descrições morfológicas, bioquímicas e filogenéticas, para que comecem a existir recomendações para esta nomenclatura (Diaz, Hong, Dupuy, & Strausbaugh, 2016).

O presente trabalho é uma revisão dos constituintes do micobioma oral em indivíduos saudáveis e doentes à luz das novas técnicas genómicas e metagenómicas disponíveis para identificar e caracterizar os fungos. Em relação aos indivíduos doentes a revisão centrou-se em pacientes com doenças sistémicas e com fatores predisponentes para a ocorrência de infeções da cavidade oral. Estes são alguns dos grupos de indivíduos que muitas vezes comparecem na consulta de Medicina Dentária e é importante para o Médico Dentista manter-se actualizado nesta área em constante evolução de modo a que possa agir eficazmente ao nível do diagnóstico, terapêutica e prevenção das doenças orais causadas por fungos.

Para a elaboração deste trabalho foi efectuada uma pesquisa na PubMed com as palavras-chave “*Oral mycobiome*”, da qual resultaram 24 resultados e “*oral*” “*fungus*” “*microbiota*” da qual resultaram 43 resultados. Na primeira pesquisa procedeu-se à leitura de todos os *abstracts* e foram seleccionados os 10 artigos com importância e que iam de acordo aos objetivos do presente trabalho. Da segunda foram seleccionados 8 artigos. A bibliografia citada nestes 18 artigos serviu de base para a obtenção de outros artigos extraídos do PubMed. Deu-se preferência aos artigos com menos de cinco anos.





## 2 MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO DEPENDENTES DA CULTURA

Os métodos de identificação dependentes da cultura ainda são os mais utilizados no que toca ao diagnóstico de infecções fúngicas. A maior parte dos fungos patogénicos não têm exigências específicas no que toca a necessidades nutritivas e crescem facilmente nos meios de cultura. Estes podem ser enriquecidos ou selectivos. Os meios enriquecidos mais utilizados são o meio *Sabouraud dextrose agar*, o meio *potato dextrose agar* e o *malt extract agar*, por permitirem a cultura dos fungos mais comuns. No entanto alguns fungos são mais exigentes e necessitam de outros meios mais ricos como do BHI (*brain heart infusion*) ou o meio *Sabouraud* com BHI. Estes meios favorecem o crescimento de fungos dimórficos (Freitas & Lopes, 2014).

Em algumas situações é necessária adição de antibacterianos (quando existem amostras contaminadas com bactérias) ou de antifúngico (populações fúngicas mistas). Neste caso faz-se a adição de cicloheximida (actidiona) que inibe a flora contaminante. No entanto este antifúngico pode inibir o crescimento de fungos patogénicos ou potencialmente patogénicos, por isso deve-se utilizar um meio de controlo (sem o antifúngico, em simultâneo). Estes meios são considerados meios selectivos (Freitas & Lopes, 2014).

### 2.1 Estudo do género *Candida* e outras leveduras

A *Candida albicans* é a espécie mais frequentemente cultivada e mais estudada da cavidade oral (Diaz, Hong, Dupuy, & Strausbaugh, 2016).

Nas amostras biológicas a *Candida spp.* apresenta-se como leveduras redondas ou ovais, em divisão, sem cápsula. Por vezes é filamentada (Freitas & Lopes, 2014). Em meios sólidos, formam colónias brancas ou bege, circulares, bem delimitadas e cremosas/mucosas, num período que demora entre um a cinco dias. São unicelulares e a sua reprodução é maioritariamente por gemulação. No entanto, quando se verificam certas condições ambientais, podem formar hifas verdadeiras, pseudo-hifas, cápsula, artrósporos e outras estruturas. (Freitas & Lopes, 2014).

O meio mais frequentemente utilizado para isolar estas leveduras é o *Sabouraud dextrose agar* (SDA), que suprime o crescimento de várias espécies de bactérias, devido ao seu baixo pH ( $5,6 \pm 0,2$  a  $25^{\circ}\text{C}$ ). Geralmente este meio é incubado de modo aeróbico

a 37°C entre 24 - 48 horas. As colónias formadas pelas leveduras deste género têm um aspeto cremoso e convexo com diâmetro entre 1 – 3 mm, e raramente se consegue distinguir entre as suas espécies. Para este fim é necessário usar um meio de diferenciação cromogéneo (Freitas & Lopes, 2014; Williams & Lewis, 2000).

### 2.1.1 Meios de cultura cromogéneos

Os meios cromogéneos também são meios selectivos para o isolamento dos fungos. Inibem o crescimento das bactérias e permitem a identificação de espécies de *Candida* que dão origem a colónias com diferentes cores (Freitas & Lopes, 2014).

São exemplos os seguintes meios (disponíveis comercialmente): chromID™ *Candida* (bioMérieux, França); Fluroplate (Merck, Alemanha), Candichrom® (ELITech Group, França), e CHROMagar® *Candida* (Becton Dickinson GmbH, Alemanha), que identifica *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei* e *C. dubliniensis*, baseando-se na cor e forma da colónia (Williams & Lewis, 2000).

O meio chromID™ *Candida* (bioMérieux, França) permite o isolamento e identificação direta de *C. albicans*. Esta espécie adquire coloração azul pela hidrólise de um substrato cromogénico específico da enzima hexosaminidase, que é a patente da bioMérieux (França). Também faz a identificação preliminar de outras espécies como *C. tropicalis*, *C. kefyr* e *C. lusitaniae*, que apresentam coloração rosa pela hidrólise de um substrato da  $\beta$  glucosidase (Tabela 1).

O meio CHROMagar® *Candida* é utilizado para isolar e identificar *C. albicans*, *C. krusei*, *C. dubliniensis* e *C. tropicalis*. Neste meio ocorre a hidrólise do substrato  $\beta$  glucosaminidase e a diferenciação entre espécies faz-se pela morfologia e cor das colónias (Araujo et al., 2005) (Tabela 1).

O meio Candichrom® permite a identificação direta de *Candida albicans* em 24 horas de incubação (a 37°C) e o isolamento de outros fungos. A identificação de *Candida* acontece pela hidrólise de substrato cromogénico, ocorrendo a formação de colónias azuis (Tabela 1).

### 2.1.2 Meio de cultura Fluorogénicos

O meio de cultura Fluoroplate (Merck, Alemanha) identifica *C. albicans* pela capacidade desta hidrolisar um substrato através da enzima *N*-acetil-galactosaminase, gerando um substrato fluorogénico. A incubação neste meio é feita entre 30 a 37°C

durante 18 – 24 horas e a identificação de colónias de *C. albicans* é feita pela observação da sua fluorescência sob luz UV (365nm) (Williams & Lewis, 2000).

**Tabela 1** - Resultados da cultura de *Candida spp.* em diferentes meios cromogénicos\*

	Espécie	Cor e aspeto das colónias
<b>chromID™</b>	<i>C. albicans</i>	Colónias azuis
	<i>C. tropicalis</i>	Colónias cor-de-rosa
	<i>C. kefyr</i>	Colónias cor-de-rosa
	<i>C. lusitaniae</i>	Colónias cor-de-rosa
	<i>C. krusei</i>	Colónias branco-sujo com aspeto seco
<b>CHROMagar® Candida</b>	<i>C. albicans</i>	Colónias verde-claras com aspeto liso
	<i>C. krusei</i>	Colónias cor-de-rosa claro com rebordo esbranquiçado com aspeto rugoso
	<i>C. tropicalis</i>	Colónias azuis metalizadas com ou sem halo violeta com aspeto liso
	<i>C. dubliniensis</i>	Colónias verde-escuras, lisa
	Outras espécies	Incolor, bege claro ou transparente.
<b>Candichrom®</b>	<i>C. albicans</i>	Colónias azuis ou esverdeadas
	<i>C. tropicalis</i>	Colónias brancas
	<i>C. glabrata</i>	Colónias com cor branca com aspeto cremoso
	<i>C. krusei</i>	Colónias branco-sujo com aspeto seco

\*Adaptado de Araujo et al., (2005); Souza, Ortiz, Mello, & Oliveira, (2015) e dos fabricantes - chromID™ Candida (bioMérieux, França); CHROMagar Candida (Becton Dickinson GmbH, Alemanha) Candichrom® (ELITech Group, França).

### 2.1.3 Testes complementares de identificação de leveduras

A *Candida albicans* é das leveduras mais isoladas do organismo humano, incluindo a cavidade oral e a sua identificação é feita através de testes simples e rápidos. O teste mais utilizado para a sua identificação é o teste de formação de tubos germinativos. Apenas esta espécie de *Candida* consegue produzir tubos germinativos em soro humano fresco num intervalo de três horas. (Freitas & Lopes, 2014; Souza, Ortiz, Mello, & Oliveira, 2015). Este teste é efectuado pela realização de uma suspensão em tubo com soro humano com três ou quatro colónias; incubação a 37°C durante cerca de três horas e observação ao microscópio ótico da presença ou não dos tubos germinativos (Souza et al., 2015).

Os tubos germinativos são considerados o início das hifas verdadeiras e aparecem como filamentos que não estão constrictos ao ponto de origem da célula mãe (Figura 1).



**Figura 1** - Tubos germinativos presentes em *Candida albicans* [retirado de Williams & Lewis (2000)].

No entanto, podem ocorrer resultados falsos-positivos com *Candida tropicalis* e *Candida dubliniensis*, pois estas espécies também podem formar estruturas semelhantes após cerca de três horas de incubação (Freitas & Lopes, 2014; Souza et al., 2015). Para além do mais, entre 5 a 10% de *Candida albicans* podem não formar tubos germinativos em soro fresco. A diferenciação das espécies de *Candida* que formam tubos germinativos só pode acontecer recorrendo a testes adicionais (Souza et al., 2015). A identificação de espécies de *Candida* que não formam tubos germinativos pode fazer-se

com base nas suas características metabólicas, como a assimilação de hidratos de carbono, ou bioquímicas através dos meios cromogéneos já referidos anteriormente.

Entre as leveduras que não formam tubos germinativos também temos os géneros *Cryptococcus* e *Saccharomyces*. No género *Cryptococcus*, o *C. neoformans* é a espécie mais patogénica e pode ter cápsula. A pesquisa da cápsula deve ser feita directamente pelo método da tinta da China de modo direto no produto biológico e a sua observação permite obter uma identificação presuntiva desta espécie. Quando não possui cápsula, pode fazer-se identificação através dos testes da urease (positivo), fenoloxidase (positivo) e nitrato redutase (positivo), realizados a partir da cultura no meio *caffeic acid agar* ou *bird seed agar* (Freitas & Lopes, 2014). Neste meio esta levedura produz uma enzima – fenoloxidase – que na presença de ácido cafeico, origina a produção de melanina. A melanina é absorvida pela parede celular da levedura produzindo colónias de cor acastanhada (informação do fabricante Hardy Diagnostics, EUA).

#### **2.1.3.1 Testes de assimilação de hidratos de carbono**

##### **Auxonograma**

No auxonograma verifica-se a capacidade do fungo crescer aerobicamente na presença de um hidrato de carbono como sua única fonte de energia. Este teste é realizado num meio base de azoto contendo apenas um hidrato de carbono. É positivo quando o fungo cresce na presença do hidrato de carbono (Souza et al., 2015).

##### **Zimograma**

O zimograma testa a capacidade dos fungos fermentarem hidratos de carbono. Neste teste é colocada uma fonte de hidratos carbono em meio líquido (em cada tubo). O fungo é semeado em cada um deles e é incubado durante um período que pode ir até 15 dias a 25°C. A fermentação é revelada por formação de bolhas de gás nos tubos (produção de CO<sub>2</sub>) (Mondelli et al., 2012)

Atualmente os laboratórios utilizam sistemas automatizados vendidos comercialmente. Estes sistemas executam os testes de assimilação dos açúcares e outros testes de identificação bioquímica de leveduras. Um dos sistemas mais recorrentemente utilizados é o sistema API (BioMérieux). O sistema API Candida (Biomérieux, França) permite a identificação das leveduras mais encontradas em Microbiologia clínica num

período de 18 a 24 horas, de um modo padronizado. Este sistema consiste em 10 tubos que possuem substratos desidratados que permitem efectuar 12 testes de identificação (cinco testes de fermentação de açúcares e sete de reacções enzimáticas). As reacções ocorridas durante a incubação manifestam-se através de mudanças de cor e sua leitura é realizada visualmente através do quadro leitura (Figura 2) e a identificação obtém-se consultando o sistema de identificação (informação do fabricante, Biomérieux, França).

TESTES	COMPONENTES ACTIVOS	QDE (mg/cúp.)	REACÇÕES	RESULTADOS	
				NEGATIVO	POSITIVO
1) <u>GLU</u>	D-glucose	1,4	acidificação (GLUcose)	violeta cinzento-violeta	amarelo verde / cinzento
2) <u>GAL</u>	D-galactose	1,4	acidificação (GALactose)		
3) <u>SAC</u>	D-sacharose	1,4	acidificação (SACarose)		
4) <u>TRE</u>	D-trealose	1,4	acidificação (TREalose)		
5) <u>RAF</u>	D-rafínose	1,4	acidificação (RAFínose)		
6) $\beta$ MAL	4-nitrofenil- $\beta$ D-maltopiranosida	0,08	$\beta$ -MALtosidase	incolor	amarelo pálido- amarelo-vivo
7) $\alpha$ AMY	2-cloro-4-nitrofenil- $\alpha$ D-maltotriosida	0,168	$\alpha$ -AMYlase	incolor	amarelo pálido- amarelo-vivo
8) $\beta$ XYL	4-nitrofenil- $\beta$ D-xilopiranosida	0,095	$\beta$ -XYLosidase	incolor-amarelo muito pálido / azul / verde **	amarelo pálido- amarelo-vivo
9) $\beta$ GUR	4-nitrofenil- $\beta$ D-glucuronida	0,063	$\beta$ -GLUcRonidase	incolor / azul / verde	amarelo pálido- amarelo-vivo
10) <u>URE</u>	Ureia	1,68	UREase	amarelo-laranja pálido	vermelho
11) $\beta$ NAG (no tubo n° 8) *	5-bromo-4-cloro-3-indoxil-N-acetil- $\beta$ D-glucosaminida	0,09	N-Acetyl- $\beta$ -Glucosaminidase	incolor / amarelo	azul / verde **
12) $\beta$ GAL (no tubo n° 9) *	5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ D-galactopiranosida	0,0815	$\beta$ -GALactosidase	incolor / amarelo	azul / verde

\* Os tubos 8 e 9 são bifuncionais :  
tubo 8 :  $\beta$ XYL (teste n° 8) /  $\beta$ NAG (teste n° 11)  
tubo 9 :  $\beta$ GUR (teste n° 9) /  $\beta$ GAL (teste n° 12)

\*\* Qualquer vestígio verde na cúpula 8 =  $\beta$ XYL (-)  $\beta$ NAG (+)

**Figura 2** - Quadro de Leitura da galeria API Candida (retirado do fabricante, Biomérieux, França).

## 2.2 Estudo dos géneros *Aspergillus* e *Penicillium*

Apesar das espécies de *Candida* serem as mais isoladas da cavidade oral, a sua biodiversidade fúngica vai para além destas espécies. Alguns fungos filamentosos como *Penicillium spp.*, *Aspergillus spp.*, *Cladosporium spp.*, também são muitas vezes isolados da cavidade oral (Monteiro-da-Silva et al., 2014). A identificação dos fungos filamentosos é realizada com base na observação das suas características macroscópicas e microscópicas. Estes fungos possuem colónias extensas com crescimento aéreo. O meio no qual são colocados deve corresponder às suas necessidades nutricionais, de modo a verificar a sua velocidade de crescimento, textura, coloração e produção de

pigmento. Microscopicamente verifica-se a morfologia da hifa, a sua ramificação e o modo de formação de esporos (Freitas & Lopes, 2014).

O género *Aspergillus* desenvolve-se favoravelmente no laboratório. São fungos filamentosos e produzem hifas hialinas septadas e o aspeto das suas colónias pode variar dependendo da espécie e condições do meio de crescimento (Freitas & Lopes, 2014). O isolamento poderá fazer-se no meio de *Saboraud*, *malt extract agar* e *potato dextrose agar*. No meio de *Sabouraud*, por exemplo, o *Aspergillus niger* apresenta-se em colónias de cor negra. No meio *malt extract agar* (Neogen, Reino Unido), que é um meio com um pH baixo (5,4), *Aspergillus niger* apresenta-se como colónias com cerca de 25 mm, de cor preta no centro com bordos brancos. No meio *potato dextrose agar* que apresenta um pH de 5,6, *Aspergillus fumigatus* apresenta-se em colónias com cor azul-esverdeado.

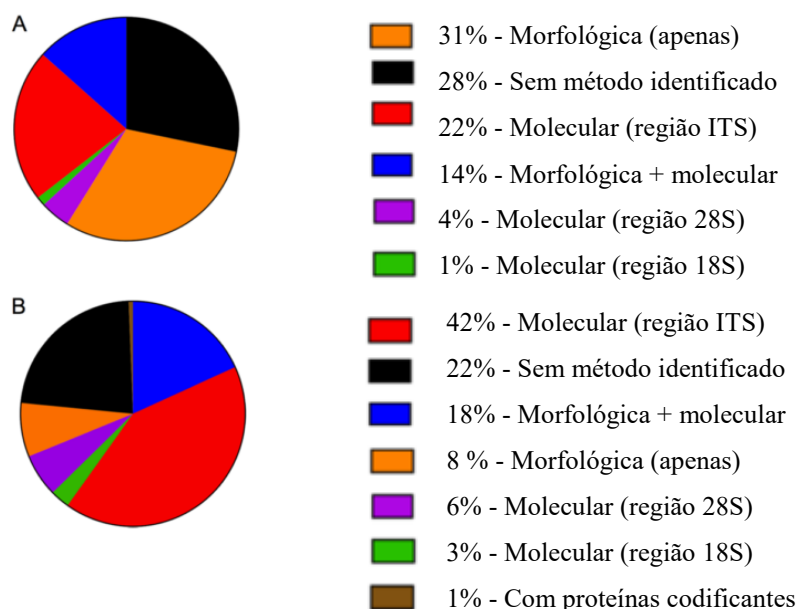
O género *Penicillium* cultiva-se no meio *Sabouraud*. Neste meio *Penicillium notatum*, por exemplo, apresenta-se com colónias de coloração branca ou creme com reverso castanho. Microscopicamente é semelhante ao género *Aspergillus*, no entanto diferencia-se pela observação da estrutura de frutificação em forma de pincel (Larone, 1995).

### **2.3 Problemas com a utilização de métodos morfológicos para a identificação de fungos**

Como já referido anteriormente na Microbiologia Clínica aplicada à identificação de fungos, tem-se utilizado deste há vários anos os métodos tradicionais que se baseiam na morfologia de estruturas de reprodução sexuada/assexuada assim como nas características fenotípicas que cada género/espécie apresenta após ser cultivado nos diversos meios. Uma abordagem apenas apoiada nas características morfológicas para a identificação de fungos poderá não ser suficiente, visto que nem sempre se consegue efectuar uma classificação ao nível da espécie corretamente. Esta incorreta identificação pode dever-se ao facto dos caracteres morfológicos por vezes induzirem ao erro devido, por exemplo, a uma evolução convergente (quando seres vivos de diferentes origens desenvolvem características semelhantes). Para além disso, anteriormente era comum denominar as fases sexuadas e assexuadas do mesmo fungo com diferentes termos, no entanto hoje em dia esta prática já não é recorrente (segundo o Código Internacional de Nomenclatura para algas, fungos e plantas) e a identificação

de fungos com base apenas na morfologia é desafiante para indivíduos não experientes (Raja, Miller, Pearce, & Oberlies, 2017).

Nos últimos anos tem-se vindo a observar um aumento da utilização da identificação de fungos com métodos moleculares. O *Journal of Natural Products* efectuou uma pesquisa onde foi divulgado os diferentes métodos utilizados ao longo dos últimos anos para a identificação taxonómica dos fungos. Os resultados dessa pesquisa encontram-se esquematizados na Figura 3 (Raja et al., 2017). Este estudo sugere que no período correspondente a 2010-2016 tem havido um aumento na tendência de utilização de métodos moleculares. No período de 2000 a 2015 somente 27% dos estudos só faziam identificação dos fungos com base em métodos moleculares; no período de 2010 a 2016, este número aumentou para 51% (Raja et al., 2017).



**Figura 3** – Métodos de identificação de fungos mais utilizados entre 2000 e 2016.

A) Estudos efetuados no período de 2000 a 2015. Cada cor identifica qual o método utilizado para a identificação taxonómica dos fungos. B) Estudos efetuados no período de 2010 a 2016. Adaptado de Raja *et al.*, (2017).



### 3 MÉTODOS MOLECULARES DE IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS ORAIS INDEPENDENTES DA CULTURA

Os métodos de identificação fúngica baseados em cultura apresentam algumas limitações uma vez que se seleccionam apenas os fungos viáveis que se multiplicam nos meios utilizados (Nonnenmann et al., 2012). Por outro lado o crescimento em meio de cultura pode levar bastante tempo o que leva a um atraso no diagnóstico (Kragelund, Reibel, & Pedersen, 2016). Os métodos moleculares permitem a identificação precisa de fungos e o diagnóstico precoce de infecções fúngicas invasivas assim como a comparação de estirpes e estudo da sua circulação num determinado ambiente, como o da cavidade oral (Viveiros, Couto, & Inácio, 2014).

Os métodos moleculares podem ser utilizados para complementar os de cultura quando não é possível fazer a identificação de todos os fungos isolados através destes últimos. Por exemplo, no estudo de Monteiro-da-Silva, Araujo, & Sampaio-Maia (2014), foi investigada a microbiota oral de 40 indivíduos saudáveis a partir de amostras salivares através de cultura e foram identificados os fungos ao nível de género e espécie, baseando-se na morfologia macro e microscópica e no sistema API (bioMérieux, França). Todos os fungos não identificáveis por estes métodos foram classificados como fungos filamentosos não identificados ou leveduras; os fungos filamentosos mais prevalentes foram posteriormente identificados através da amplificação das regiões genómicas DNAr18S e ITS (ITS1 e ITS2) recorrendo à técnica da polimerase em cadeia (PCR) (Monteiro-da-Silva et al., 2014).

Os métodos de cultura não permitem um conhecimento completo da microbiota oral. Assim em 2010, Ghannoum *et al.*, caracterizou o microbioma oral de 20 indivíduos saudáveis por pirosequenciação da região ITS e análise filogenética e revelou a existência de 74 géneros de fungos cultiváveis e 11 não cultiváveis (Ghannoum et al., 2010). Em 2014, no estudo realizado por Dupuy *et al.*, foram confirmados os resultados obtidos por Ghannoum *et al.* (2010), através da pirosequenciação da região ITS1 de amostras de saliva de indivíduos saudáveis. Finalmente, em 2016, no estudo de Diaz *et al.*, foi realizada uma comparação da composição do microbioma oral em indivíduos saudáveis usando abordagens dependentes da cultura ou métodos moleculares. Com métodos dependentes de cultura foram identificados 18 géneros de fungos (*Alternaria*, *Aspergillus*, *Emericella*, *Eurotium*, *Aureobasidium*, *Candida*, *Cladosporium*, *Cryptococcus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Saccharomyces*, *Exophiala*, *Kluyveromyces*,

*Rhodotorula*, *Scedosporium*, *Trichoderma* e *Trichosporon*) enquanto com os métodos moleculares se identificaram 27 géneros (*Alternaria*, *Aspergillus*, *Emericella*, *Eurotium*, *Aureobasidium*, *Candida*, *Cladosporium*, *Cryptococcus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Saccharomyce*, *Trichosporon*, *Coprinus*, *Cyberlindnera*, *Cytospora*, *Debaryomyces*, *Epicoccum*, *Glomus*, *Irpex*, *Malassezia*, *Mrkia*, *Phaeosphaeria*, *Phoma*, *Sarcinomyces*, *Sporobolomyces*, *Teratosphaeria* e *Trametes*)(Diaz et al., 2016).

Os métodos moleculares baseiam-se na pesquisa e análise de ácidos nucleicos. Têm uma grande especificidade, sensibilidade e rapidez em comparação com os meios convencionais de identificação, pois permitem diminuir o período de tempo existente desde a suspeita clínica até à identificação concreta do agente causador (Viveiros et al., 2014). Estes métodos têm um papel importante no diagnóstico das infecções porque se consegue trabalhar mesmo quando a quantidade da amostra é muito limitada (Gomes & Martins, 2012). As técnicas moleculares permitem a identificação dos fungos presentes na cavidade oral sem necessidade de efectuar o isolamento de uma determinada espécie ou género; a identificação realiza-se através da obtenção da(s) sequência(s) de ADN da amostra recolhida e apresentam uma maior facilidade na análise de múltiplas amostras de uma só vez (Huseyin, O'Toole, Cotter, & Scanlan, 2017). No entanto têm como desvantagens serem métodos caros e, por vezes, de interpretação clínica complexa (Gomes & Martins, 2012). Por outro lado, os métodos moleculares dependem da qualidade e quantidade do material biológico a analisar. Estas limitações podem ser eventualmente ultrapassadas pela amplificação do material genético pela reacção de PCR (Viveiros et al., 2014).

### 3.1 Reacção da polimerase em cadeia (PCR)

Os métodos de identificação de ácidos nucleicos dependem da obtenção de um número de cópias elevado da sequência-alvo (Huseyin et al., 2017).

Na reacção de PCR dá-se uma amplificação exponencial de regiões alvo. Quando esta reacção é aplicada na identificação dos fungos, normalmente as regiões de interesse a amplificar são as regiões ITS, DNAr26S, DNAr5.8S e DNAr18S (Huseyin et al., 2017).

No estudo de Baumgartner, Watts & Xia (2000) foi realizada uma avaliação dos conteúdos dos canais radiculares (24 amostras) e aspirados de líquido de abscesso/celulite de origem endodôntica (19 amostras) para a presença de *C. albicans* utilizando PCR. Essas amostras foram recolhidas de pacientes provenientes da *School of*

Dentistry Oregon Health Sciences University (Portland, Oregon, EUA). O ADN foi isolado directamente de cada amostra e os *primers* utilizados permitiam amplificar um fragmento com 276pb do gene do ARNr 18S da *C. albicans*. Os produtos da reacção de PCR foram visualizados por electroforese em gel de agarose. Este estudo confirmou que a *C. albicans* poderia estar envolvida nas infecções dos canais radiculares mais frequentemente do que se pensava. Para além disso, o estudo demonstrou que a PCR é eficiente na detecção de *C. albicans* em amostras clínicas (Baumgartner, Watts, & Xia, 2000).

Como já referido, em 2014, Monteiro-da-Silva, Araujo, & Sampaio-Maia, investigaram a micobiota oral de 40 indivíduos saudáveis a partir de amostras salivares através de cultura, morfologia macro e microscópica e no sistema API (bioMérieux, França). Todos os fungos não identificáveis foram posteriormente identificados através da amplificação das regiões genómicas DNAr18S e ITS (ITS1 e ITS2) recorrendo à técnica da polimerase em cadeia (PCR) (Monteiro-da-Silva et al., 2014).

### 3.2 PCR quantitativo em tempo real

A rapidez na identificação das espécies intervenientes nas infecções fúngicas é indispensável para se prestar ao paciente uma rápida iniciação do tratamento antifúngico (Zhang et al., 2016). A reacção de PCR em tempo real permite obter resultados em cerca de 20-30 minutos e vários estudos têm demonstrado que é muito útil para diagnosticar de forma rápida e efetiva as infecções fúngicas orais. No estudo de White *et al.* (2004), foi comparado o desempenho da cultura em meio SDA e CHROMagar Candida com a técnica de PCR em tempo real na detecção das espécies de *Candida* em amostras de lavado oral de 145 pacientes com diferentes patologias orais e de 48 indivíduos saudáveis. Por cultura, 59% das amostras dos pacientes com patologia oral e 38% das amostras do grupo controlo mostraram-se positivas para *Candida*. Pelo PCR em tempo real, 67% das amostras dos pacientes com patologia oral e 40% das amostras do grupo controlo foram positivas para *Candida*. Neste estudo o PCR em tempo real apresentou uma sensibilidade de 94% e uma especificidade de 78% (White et al., 2004).

No estudo de Vollmer *et al.* (2008) foi verificado que de um modo geral, a detecção pelo método de PCR em tempo real é cerca de duas a 15 vezes mais rápida do que pelo método tradicional de cultura, dependendo do agente patogénico (Vollmer, Störmer, Kleesiek, & Dreier, 2008). Para além disso este método, quando comparado

com os métodos convencionais, demonstra ser superior para a detecção de espécies e sua quantificação (Göhler et al., 2014).

No estudo de Ieda *et al.* (2014) foi realizada a análise de amostras de saliva e de esfregaços da base até à ponta dos 2/3 anteriores do dorso da língua, de 52 pacientes com candidíase pseudomembranosa e de 30 pacientes saudáveis. Este estudo utilizou PCR em tempo real da região ITS1 para quantificar as populações de fungos das amostras de saliva. Mostraram que o número total de produtos de PCR das amostras dos pacientes com candidíase pseudomembranosa era superior ao dos do grupo controlo e que esse número descia significativamente nos pacientes que receberam tratamento antifúngico. Concluíram ainda que o aumento destes números e da diversidade da flora oral, poderá estar envolvido na patogenicidade da candidíase pseudomembranosa. Em 2017, no estudo de Imabayashi *et al.*, também foi realizada a análise de PCR em tempo real para a quantificação da região ITS1 da flora fúngica em lavados orais de 27 pacientes com candidíase pseudomembranosa e 66 pacientes controlo. Mostraram também que a quantidade de produtos de PCR era superior em pacientes com candidíase.

### **3.3 Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) de produtos de PCR (PCR- RFLP)**

Esta técnica baseia-se na hidrólise do ADN previamente amplificado por PCR, com uma ou mais enzimas de restrição (endonucleases específicas) e separação por electroforese dos fragmentos gerados. Estes fragmentos possuem padrões de restrição que servem como uma “impressão digital” genética de uma determinada espécie (Cui, Morris, & Ghedin, 2013; El Khoury et al., 2011).

Esta técnica é frequentemente utilizada para a identificação de fungos. Por exemplo, no estudo de Shokohi *et al.* (2010) foi utilizado o PCR-RFLP da região ITS para diferenciar as espécies de *Candida* clinicamente importantes em pacientes com cancro. As amostras foram isoladas das regiões do lábio, garganta e língua. Após a reacção de PCR os produtos foram digeridos com as enzimas *MspI* e *BlnI*. As espécies identificadas foram *C. albicans* (77,5%), *C. glabrata* (15%), *C. tropicalis* (5%) e *C. krusei* (2,5%) (Shokohi, Sotah, Pouri, Hedayati, & Mayahi, 2010).

### 3.4 Heterogeneidade de comprimento dos produtos de PCR (*Length Heterogeneity PCR /PCR- LH*)

É uma ferramenta molecular que permite identificar organismos em amostras mistas sem necessidade de cultura. Esta técnica analisa as populações microbianas baseando-se nos comprimentos dos produtos de PCR gerados a partir do gene do ARNr 16S ou da região ITS fúngica. Cada região apresenta um perfil através do qual se pode perceber a comunidade microbiana. No caso dos fungos é utilizada a região ITS. Os organismos presentes numa dada comunidade são determinados pela utilização de uma base de dados que contém os tamanhos dos amplicões “esperados” para um determinado conjunto de *primers*. Assim os comprimentos dos fragmentos são comparados com os da base de dados e a identificação dos organismos é feita. O PCR- LH é uma ferramenta rápida, reprodutível, pode ser efectuado quando as amostras são pequenas e em simultâneo em várias amostras. Para além disso dá informação dos membros de uma determinada comunidade fúngica e da sua abundância relativa (Doud, 2010).

Em 2014, no estudo de Ieda *et al.* foi examinada a diversidade das espécies fúngicas em pacientes com candidíase pseudomembranosa (Ieda et al., 2014). Posteriormente em 2017 no estudo de Zakaria *et al.* (2017) foi realizada uma investigação do microbioma oral em 410 indivíduos idosos através de PCR-LH da região ITS para se verificar a diversidade fúngica dos indivíduos. As espécies mais frequentemente identificadas foram *C. albicans* (98.4%), *C. glabrata* (54%), *C. dubliniensis* (38.1%), *C. tropicalis* (9.5%) e *Malassezia restricta* (6.3%) (Zakaria et al., 2017).

### 3.5 PCR- Multiplex

Esta técnica utiliza múltiplos pares de primers na mesma reacção pelo que a amplificação de várias sequências-alvo ocorre em simultâneo (Viveiros et al., 2014).

O PCR-Multiplex tem sido aplicado com sucesso na identificação e quantificação de fungos em amostras de lavado oral de pessoas saudáveis e doentes permitindo conhecer melhor a etiologia e patogénese fúngica de diferentes patologias orais bem como a escolha da melhor terapia antifúngica. No estudo de Liguori *et al.* (2009) foi utilizada esta técnica para a identificação das espécies de *Candida* directamente no lavado oral de 95 pacientes com diagnóstico presuntivo de Candidíase Oral. Estes resultados foram depois comparados com testes fenotípicos obtidos por cultura (meios cromogénicos, testes de assimilação de hidratos de carbono). Nos

lavados orais, verificou-se a presença de *Candida* em 81 dos 95 pacientes tanto pelo método de cultura e como pelo PCR-Multiplex confirmando a utilidade do PCR multiplex no diagnóstico das micoses orais (Liguori et al., 2009).

O PCR-Multiplex permite a detecção de mais de uma espécie numa amostra (Liguori et al., 2009). Assim em apenas uma reação é possível retirar mais informação, o que leva a uma minimização dos custos de análise por amostra até 40% (retirado do fabricante ThermoFisher Scientific, EUA). A automatização do processo levanta ainda a possibilidade de diminuição e/ou eliminação dos erros do operador. É uma técnica fácil, precisa e não dispendiosa, podendo ser considerada também uma alternativa aos métodos tradicionais de cultura, nomeadamente em laboratórios já equipados com estas tecnologias de Biologia Molecular (Liguori et al., 2009).

## 4 IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS POR SEQUENCIAÇÃO DO ADN

Os fungos podem ser classificados por sequenciação genómica ou parcial. Atualmente há numerosas tecnologias de sequenciação e cada uma delas tem uma estratégia diferente. No entanto existem etapas comuns entre elas, nomeadamente, a preparação da amostra e da biblioteca genómica (Figura 4).

### Extração do ADN

A caracterização do microbioma oral por sequenciação requer a prévia extração de ADN através de uma de múltiplas tecnologias (Huseyin et al., 2017).

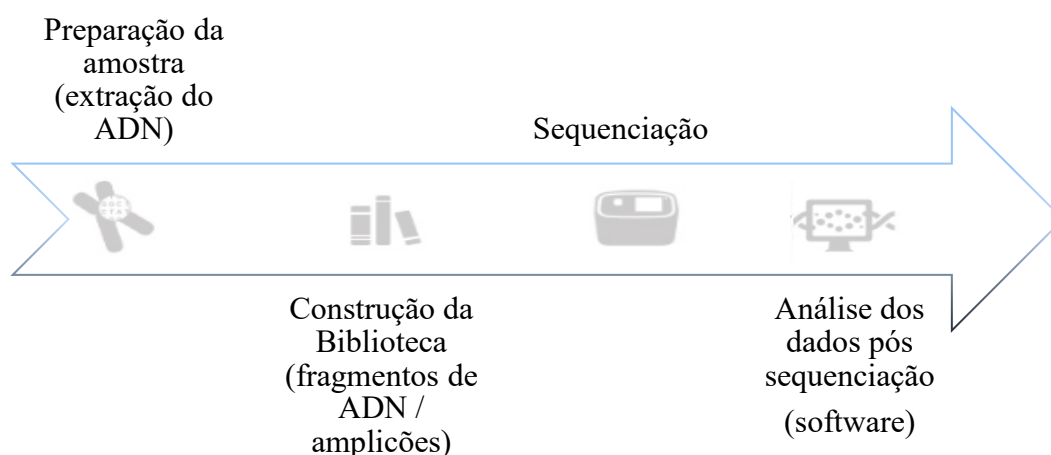
Existem métodos (*kits*) comerciais de extração do ADN que o conseguem extrair na sua totalidade e de um modo relativamente eficiente, mas que por vezes podem ter problemas na extração do ADN fúngico devido à sua parede celular. Estes *kits* têm sido modificados com a adição de um passo de lise enzimática específica para fungos e outro de lise mecânica através em de esferas de metal ou de vidro (Huseyin et al., 2017).

### Preparação das bibliotecas genómicas

Um passo chave da preparação da amostra de ADN genómico para sequenciação é a criação de uma biblioteca genómica que é uma coleção de fragmentos de ADN de tamanhos semelhantes com sequências adaptadoras nas suas regiões terminais 5' e 3'. A preparação da biblioteca genómica tem quatro etapas. Na primeira etapa o ADN genómico pode ser fragmentado utilizando meios físicos, mecânicos ou enzimáticos; se a sequência alvo for conhecida, pode recorrer-se ao PCR para se efetuar a amplificação de fragmentos alvo (Head, Komori, LaMere, Whisenant, & et al., 2014; Simbolo et al., 2013). Neste caso obter-se-á apenas uma biblioteca de amplicões. No segundo passo, sequências de ADN específicas designadas de adaptadores são ligadas às regiões 3' e 5' do ADN fragmentado ou dos amplicões. Um dos adaptadores contém o local onde o *primer* de sequenciação se liga e o outro é utilizado para ancorar o ADN a uma superfície para sequenciação. Na terceira etapa faz-se a seleção dos fragmentos para a sequenciação. Existem dois métodos para se realizar esta seleção: eletroforese em gel e separação magnética. Na eletroforese em gel os fragmentos de ADN com os adaptadores são separados em função da sua mobilidade, que por sua vez é função do seu tamanho. Depois a banda correspondente ao tamanho desejado é recolhida. No segundo método o ADN liga-se a esferas de metal através dos adaptadores e é separado

do restante material por magnetismo. O tamanho dos fragmentos de ADN é importante para uma sequenciação com alta qualidade e precisão. Nas bibliotecas de amplicões o passo de seleção do tamanho não é necessário, pois os *primers* utilizados na reação de PCR foram desenhados para se obter fragmentos de ADN com o tamanho desejado. A etapa final é a quantificação da biblioteca que é importante para garantir a representatividade plena do ADN a sequenciar na biblioteca. O método qPCR é o normalmente utilizado (Di Bella, Bao, Gloor, Burton, & Reid, 2013; Simbolo et al., 2013).

A seguinte fase é a sequenciação que pode ser efetuada através de plataformas de alto rendimento, como é o caso da sequenciação com inibidores terminadores de cadeia, plataforma 454 GS-FLX (Roche), plataforma Illumina, SOLiD e Ion Torrent. A sequenciação gera um grande volume de informação. Para que se consigam retirar conclusões é necessário que a informação seja analisada recorrendo a programas de computador. A análise das sequências de genómicas de ADN com fins identificativos recorre ao seu alinhamento com sequências genómicas de referência existentes em bases de dados, seguida de análise filogenética. Outra alternativa mais económica e igualmente eficaz é através da análise de sequências assinatura (DNA *barcoding*) características de cada espécie ou género fúngico. (Di Bella et al., 2013).



**Figura 4** - Fluxograma operacional explicativo das etapas a realizar nos métodos moleculares de sequenciação de Nova Geração. Adaptado de Thermo Fisher Scientific, disponível em <https://www.thermofisher.com/us/en/home/life-science/sequencing/next-generation-sequencing.html>.



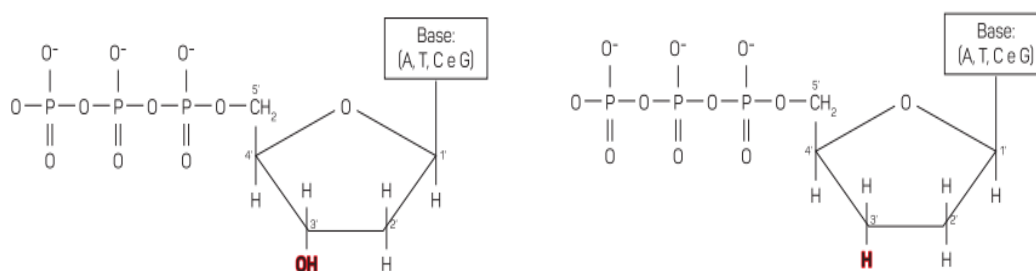
## 5 MÉTODOS E PLATAFORMAS DE SEQUENCIÇÃO

### 5.1 Sequencição de 1<sup>a</sup> Geração

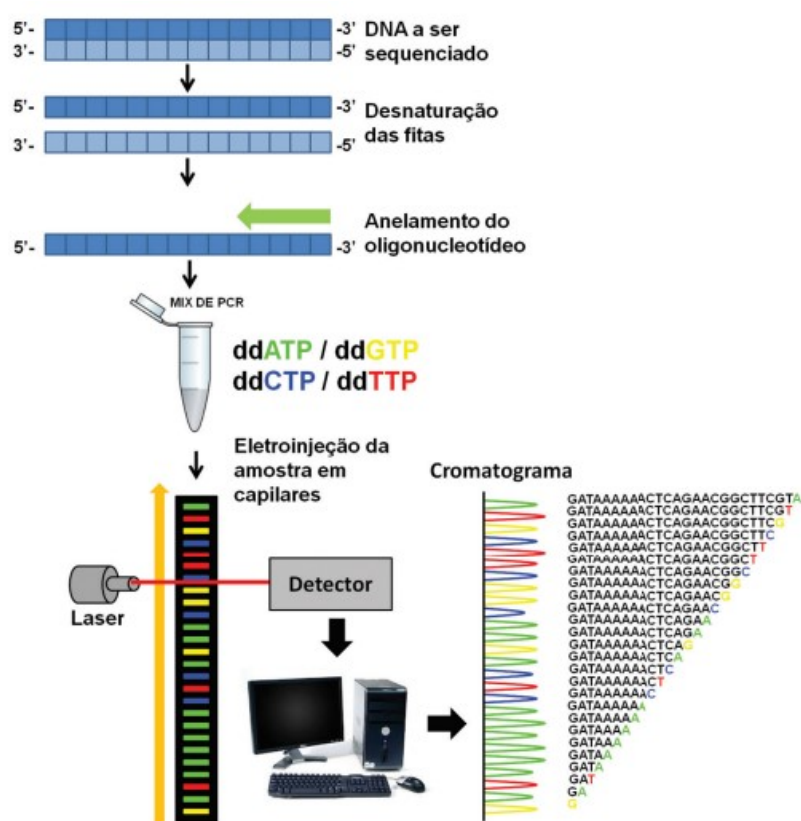
#### 5.1.1 Sequencição com terminadores de cadeia

Este método foi desenvolvido por Sanger, Nicklen e Coulson nos anos 70 (Sanger, Nicklen, & Coulson, 1977).

A reação inicia-se pela desnaturação do fragmento de ADN de dupla cadeia, originando duas cadeias simples. *Primers* complementares ligam-se à cadeia simples de ADN e possibilitam a síntese da cadeia complementar por uma ADN polimerase. A ADN polimerase continua a fazer a elongação da cadeia até à adição de um didesoxinucleotido trifosfatado (ddNTP) em vez de um desoxinucleotido trifosfatado (dNTP) (Figura 5). Este ddNTP, marcado por um fluorocromo, faz a terminação da cadeia. Os produtos da reação de sequencição marcados com os fluorocromos ao serem submetidos a eletroforese capilar, passam por um feixe de laser que promove a sua excitação. A luz emitida pelos fluorocromos é detetada e a informação é processada através de um computador que traduz a informação em sequências (Moreira, Fietto, & Maciel, 2015) (Figura 6).



**Figura 5-** Estrutura química de um Didesoxinucleótido (ddNTP) e de um Desoxinucleótido (dNTP). Retirado de Leandro M. Moreira (2016).



**Figura 6** – Esquema da sequenciação com inibidores terminadores de cadeia. Usam-se baixas concentrações de ddNTPs e altas concentrações de dNTPs. Retirado de Leandro M. Moreira (2016).

O estudo de Aas *et al.* (2007) foi um dos primeiros estudos de sequenciação do microbioma oral. Neste estudo os amplicões clonados da placa subgengival de 14 pacientes VIH-positivos, com gengivite, periodontite ou eritema gengival linear, foram sequenciados recorrendo à sequenciação com inibidores terminadores de cadeia. Apenas foram identificadas *C. albicans* e *Saccharomyces cerevisiae* (Aas et al., 2007).

## 5.2 Sequenciação de 2ª Geração

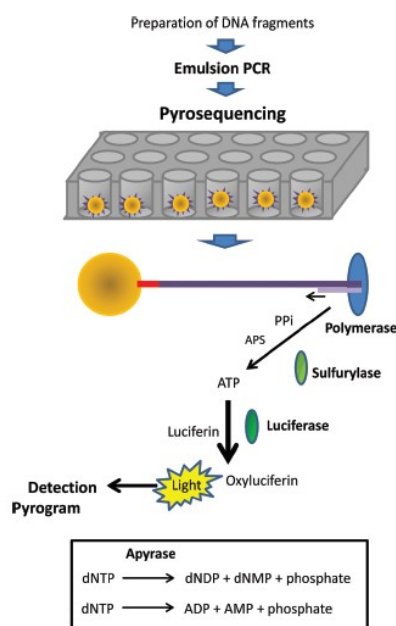
Este tipo de tecnologias começou a ser comercializado em 2005 e têm evoluído a elevada velocidade, promovendo a sequenciação do ADN em plataformas que conseguem produzir informação sobre milhões de pares de bases em apenas uma corrida (Carvalho & Silva, 2010).

Estas tecnologias possuem o poder de produzir informação em quantidade muitas vezes superior à sequenciação com inibidores terminadores de cadeia, com uma economia de tempo e custo por base (Carvalho & Silva, 2010).

### 5.2.1 Pirosequenciação (Plataforma 454 GS- FLX Roche)

A pirosequenciação é uma técnica baseada na detecção do pirofosfato libertado (PPi) durante a síntese do ADN (Huse, Huber, Morrison, Sogin, & Welch, 2007; Ronaghi, 2001). A cascada inicia-se com a reação de polimerização. A polimerase ao incorporar o novo nucleótido liberta PPi. Este PPi libertado é então convertido a ATP pela ATP sulforilase, que providencia a energia à enzima luciferase para oxidar a luciferina de forma a gerar a luz visível (Figura 7). O molde inicial pode ser ADN ou ARN, no entanto prefere-se a utilização de ADN, visto que as ADN polimerases mostram uma actividade catalítica maior que as ARN polimerases (Ronaghi, 2001; Siqueira, Fouad, & Rôças, 2012).

Este método de sequenciação foi patenteado pela Roche e incluído na sua plataforma 454 que foi comercializada a partir de 2005 (Huseyin et al., 2017). O sistema 454 tem sido utilizado na caracterização do microbioma oral. A título de exemplo, em 2010, Ghannoum *et al.*, descreveram o microbioma oral pacientes saudáveis através da pirosequenciação 454 *multitag* da região ITS, de amostras de lavado oral (Ghannoum et al., 2010). Da mesma forma, Dupuy *et al.* (2014) caracterizaram os fungos da saliva não estimulada de seis indivíduos saudáveis num estudo piloto, utilizando a pirosequenciação 454 da região ITS numa análise taxonómica. Dessa experiência foram obtidos resultados concordantes com Ghannoum *et al.* (Dupuy et al., 2014).



**Figura 7** – Esquema do processo de Pirosequenciação. Adaptado de Siqueira et al., (2012).

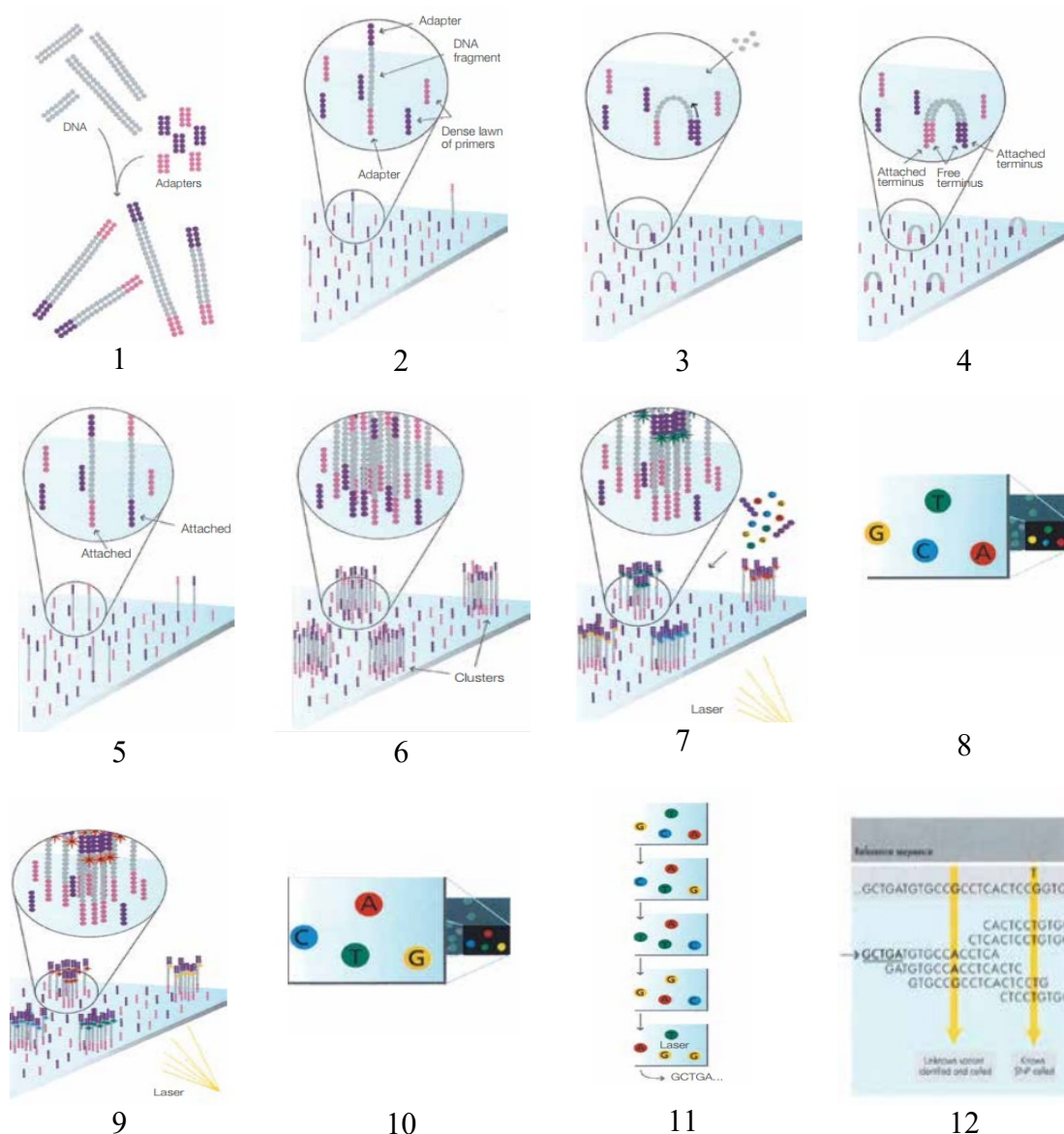
### 5.2.2 Plataforma Illumina

Este sequenciador foi comercializado originalmente em 2007 (Huseyin et al., 2017). A sequenciação é realizada por síntese e apresenta várias etapas que se encontram descritas esquematicamente na Figura 8.

Esta tecnologia de sequenciação, conjuntamente com a análise filogenéticas das sequências geradas, foi usada por Brandilyn *et al.* (2017) na caracterização do micobioma oral de 30 indivíduos adultos (15 com doença periodontal e 15 sem doença periodontal) através de amostras de lavado oral. Neste estudo verificou-se a existência de 81 géneros, 154 espécies e 8943 unidades taxonómicas operacionais (UTOs) (em todas as amostras analisadas) (Peters, Wu, Hayes, & Ahn, 2017).

OTU representa um conjunto de microrganismos que contém sequências que são semelhantes entre si (Schloss & Westcott, 2011) enquanto uma espécie é uma categoria taxonómica pertencente a um sistema hierárquico (Aldhebiani, 2017; Stackbrandt & Goebel, 1994). O conceito de espécie tem vindo a ter uma evolução ao longo do tempo, mas com a Teoria da Evolução de Darwin e Wallace, as leis de Mendel e o desenvolvimento da Teoria Cromossómica de Boveri-Sutton, designou-se ser um grupo de organismos que partilham um ancestral comum (Aldhebiani, 2017).

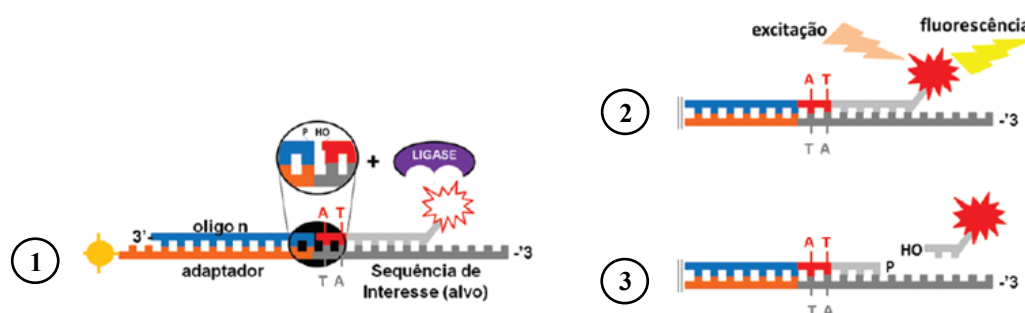
O número de UTOs fúngicas por participante tendeu a ser superior nos grupos com doença periodontal. O género *Candida* foi mais abundante nos pacientes com doença periodontal (33,2%) do que nos pacientes com saúde periodontal (2,2%). O mesmo aconteceu com os pacientes com perda de dentes. Abundância de *Candida* também aumentava com o aumento da quantidade de dentes perdidos: um a dois dentes perdidos (3,2%); três a quatro dentes perdidos (16,6%); cinco ou mais dentes perdidos (73,9%). No entanto devido à amostra reduzida, estes resultados não tiveram valor estatístico. Este estudo sugeriu então que as espécies de *Candida* são mais abundantes na cavidade oral de indivíduos com doença periodontal (Peters et al., 2017).



**Figura 8** – Etapas da sequenciação da plataforma Illumina (retirado do fabricante Illumina Inc, EUA). 1- Preparação da amostra; 2 - Ligação do ADN à superfície de um *microchip*; 3 - Amplificação em ponte; 4 - Fragmentos com dupla cadeia; 5 - Desnaturação das moléculas de dupla cadeia; 6 - Amplificação completa; 7 – Determinação da primeira base: o primeiro ciclo de sequenciação inicia-se pela adição de quatro terminadores reversíveis, primers e ADN polimerase; 8 – Imagem da primeira base: emissão de fluorescência de cada *cluster* e identificação da primeira base; 9- Determinação da segunda base: repetição da incorporação dos quatro terminadores reversíveis, primers e ADN polimerase; 10 – Imagem do segundo ciclo químico; 11 – Sequenciação após múltiplos ciclos químicos: os ciclos são repetidos para determinar a sequência de bases no fragmento; 12 – os dados são alinhados e comparados e diferentes sequências são identificadas. Adaptado do fabricante, Illumina, EUA.

### 5.2.3 Plataforma SOLiD

Na plataforma SOLiD (*Applied Biosystems*, EUA) a sequenciação é realizada por ligação de oligonucleótidos (sonda) à sequência *primer* por uma ADN ligase. A reação emite fluorescência por excitação do fluorocromo e é dependente do nucleótido incorporado. A fluorescência é registada e convertida em cor. Finalmente ocorre a clivagem num ponto específico que provoca a libertação das bases universais e do fluorocromo (Figura 9). Este passo é repetido até que toda a extensão do ADN molde seja coberta por dinucleótidos (Siqueira et al., 2012).



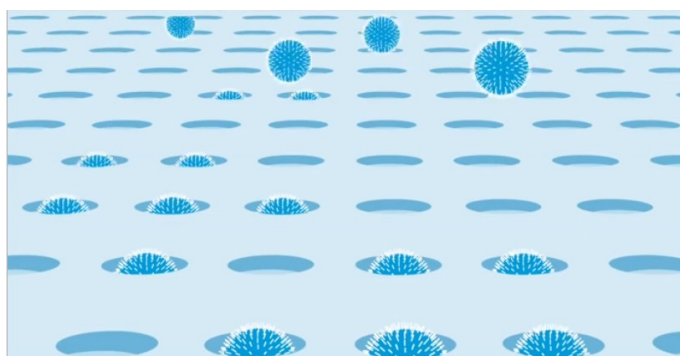
**Figura 9** – Etapas da sequenciação utilizada na Plataforma SOLiD. Adaptado de Moreira et al., (2015). (1) A sequência alvo encontra-se ligada a um adaptador e a uma esfera. A sonda (oligonucleotídeos) liga-se ao complexo sequência-alvo – adaptador – esfera. Posteriormente a sonda liga-se à sequência primer por meio de uma ADN ligase. (2) Dependente do nucleótido incorporado a reacção emite fluorescência por excitação do fluorocromo. (3) Clivagem num ponto específico que provoca a libertação das bases universais e do fluorocromo (Moreira et al., 2015).

Os novos sequenciadores que utilizam esta tecnologia conseguem produzir leituras de sequências que têm entre 50 a 75pb (Siqueira et al., 2012).

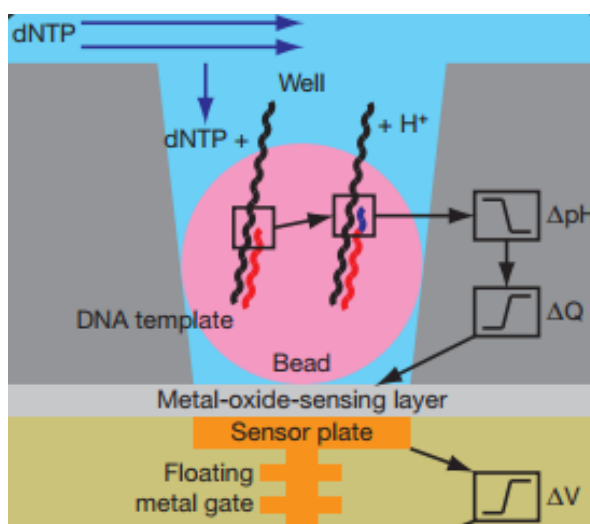
Embora a sequenciação 454 e Illumina sejam muitas vezes utilizadas em estudos metagenómicos, a sequenciação com a plataforma SOLiD não é muito utilizada nesta área (Mitra et al., 2013). Esta plataforma ainda não foi aplicada ao estudo do microbioma oral. No entanto foi realizado um estudo por Mitra *et al.* (2013) que investigou a *performance* da sequenciação SOLiD, em comparação com a abordagem de pirosequenciação e sequenciação com inibidores terminadores de cadeia, num contexto metagenómico em amostras de fezes humanas de modo a identificar o microbioma intestinal. A conclusão deste estudo foi que a sequenciação com a plataforma SOLiD poderia ser uma opção viável para estudar microbiomas complexos (Mitra et al., 2013).

### 5.2.4 Plataforma Ion Torrent

A plataforma *Ion Torrent PGM™* (Ion PGM Sequencer; Life Technologies, USA) foi lançada em 2011 (Di Bella et al., 2013; Nilsson et al., 2013). O processo de sequenciação inicia-se quando a amostra de ADN é fragmentada. Cada fragmento depois é ligado a uma esfera e é copiado até que cubra essa esfera. As esferas escoam por um *chip* (Figura 10) até um poço (Figura 11) e aí são submersas numa solução com nucleótidos. Sempre que um nucleótido é incorporado ocorre a libertação de um ião de hidrogénio. A libertação dos iões de hidrogénio muda o pH da solução do poço. Essa mudança de pH é medida e convertida em voltagem que muda consoante o nucleótido incorporado (Di Bella et al., 22013).



**Figura 10** – Arquitetura do *chip* por onde escoam as esferas durante a sequenciação com Ion Torrent. Retirado de ThermoFisher, EUA.



**Figura 11** – Representação simplificada de um poço contendo uma esfera ligada ao fragmento de ADN. Por baixo (a cinzento) observa-se o sensor que identifica a mudança de pH. Retirado de Rothberg *et al.* (2011).

Esta tecnologia devido aos seus novos protocolos, que permitem leituras até 400pb, também tem começado a entrar em competição pelo mercado com as restantes, pois tem um baixo custo e apresenta-se como uma solução de alto rendimento (Cui, Morris, & Ghedin, 2013).

No estudo de Tonge, Pashley & Gant (2014), analisou-se comunidades fúngicas utilizando a sequenciação das regiões ITS1, ITS2 e LSU com a plataforma Ion Proton em duas populações fúngicas cultivadas em meio *potato dextrose agar*. Concluiu-se que esta plataforma quando correctamente aplicada pode dar uma avaliação qualitativa dos membros do micobioma (Tonge, Pashley, & Gant, 2014). Até à data ainda não foram realizados estudos clínicos do micobioma oral com esta tecnologia.

As tecnologias descritas apresentam vantagens e desvantagens que estão resumidas na Tabela 2 e 3.



**Tabela 2** - Descrição das vantagens e desvantagens correspondentes a cada método utilizado para caracterizar o microbioma \*

<b>Método</b>	<b>Vantagens</b>	<b>Desvantagens</b>
<b>PCR</b>	1. Amplificar uma sequência precisa de ADN; 2. Rigor, elevada sensibilidade e especificidade.	Necessidade de conhecer a sequência de ADN a amplificar (primers específicos)
<b>PCR em Tempo Real</b>	1. Mais sensível que as abordagens dependentes da cultura	Falsos-positivos.
<b>PCR- RFLP</b>	Identificação rápida, fácil e confiável em comparação com os métodos tradicionais	A escolha de sonda/enzima de restrição é crucial
<b>PCR-LH</b>	1. Rápida, reprodutível 2. Amostras pequenas	Alguns <i>kits</i> comerciais não são utilizados em espécies com genomas largos e complexos
<b>PCR Multiplex</b>	1. Detecção de mais de uma espécie numa amostra 2. Processo automatizado 3. Rápido, fácil, preciso e não dispendioso	1. Presença de múltiplos primers pode levar à hibridização errada no fragmento de ADN.
<b>Sequenciação com inibidores terminadores de cadeia</b>	1. Alta confiabilidade 2. Baixo custo/amostra 3. Ideal para estudo de genes específicos	1. Dificuldade em sequenciar Genomas 2. No máximo 96 amostras de cada vez
<b>Pirosequenciação 454</b>	1. Leituras até 1Kb	Problemas com erros em regiões homopoliméricas
<b>Illumina</b>	1. Alto <i>throughput</i> (líder) 2. Baixo custo por base 3. Muito versátil	Problema em regiões com elevado conteúdo de GC
<b>SOLiD</b>	1. Alto <i>throughput</i> (a seguir a Illumina) 2. Leituras muito curtas 3. Precisão de 99.94%	1. Grande volume de dados - capacidade computacional 2. Equipamento e reagentes caros
<b>Ion Torrent</b>	Equipamento e reagentes são baratos	Problema com sequências homopoliméricas

**Tabela 3** - Propriedades (química, comprimento em pb e tempo de processamento) dos sequenciadores de alto rendimento (Di Bella et al., 2013).

Sequenciadores	Química	Comprimento em (pb)	Tempo de processamento
<b>454 GS-FLS (Roche)</b>	Pirosequenciação	700	23 horas
<b>SOLiD (Life Technologies)</b>	Ligação de oligonucleotídeos	1 x 75 Frag. 2 x 50 MP	8 dias
<b>Ion Torrent</b>	Detecção de prótons	100 ou 200	3 horas

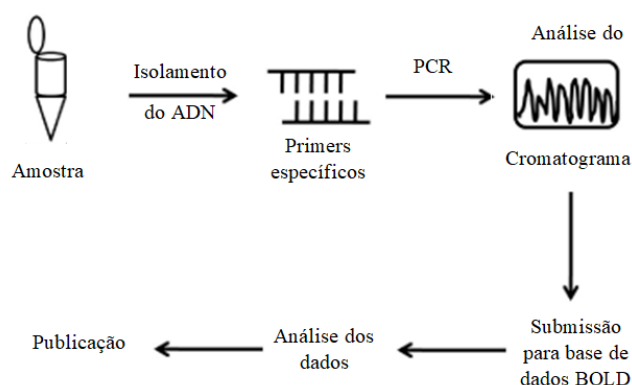
\* Adaptado de Cui, Morris, & Ghedin, (2013); Dijk, Auger, Jaszczyszyn, & Thermes, (2014) Rasmussen (2012).

### 5.3 Estratégias de identificação de fungos com base nas sequências de ADN

Nesta secção são discutidos os dois métodos utilizados para a identificação de fungos através da sequenciação: ADN *Barcoding*, utilizando a região ITS, e análise filogenética.

#### 5.3.1 ADN *Barcoding*

Esta é uma ferramenta para a identificação das espécies que se baseia em sequências de ADN que contém apenas entre 400 a 800 pb e que são características de cada espécie. As sequências são validadas e submetidas a uma de múltiplas bases de dados que permitem a identificação das espécies por comparação com sequências de referência (Figura 12 e Tabela 4) (Genes, Kress, & Erickson, 2008).



**Figura 12** – Fluxograma do processo de *barcoding* do ADN. Adaptado de Purty & Chatterjee (2016).

Uma das bases de dados mais utilizadas é a *Barcode of Life Database (BOLD)*, que é um portal colaborativo para a comunidade científica. Aí a informação é armazenada, analisada e os registos das sequências obtidas são publicados (BOLDSystems©, disponível em <http://www.boldsystems.org/> a 20/11/2017).

A identificação de espécies de fungos baseada num código de barras (*barcode*) fúngico parece ser uma abordagem bastante atraente para explorar a vasta diversidade fúngica. No entanto tem que se ter em conta que esta identificação baseada na informação de sequências de ADN de um ou dois *loci* é de qualidade inferior à análise filogenética de sequências genómicas (Xu, 2016). As regiões mais frequentemente seleccionadas são a região 18S de ADNr (*small subunit* ou SSU), a região 28S de ADNr (*large subunit* ou LSU) e a região ITS (*internal transcribed spacer*) (Cui et al., 2013). A região 28S tem vindo a ser rejeitada como sequência alvo devido à sua falta de poder de discriminação para várias espécies. A região 18S é maioritariamente conservada pelo que a sua amplificação é fácil numa grande variedade de fungos. O ITS é a região mais diversa e permite uma maior discriminação de género por análise filogenética (Cui et al., 2013).

Assim, em 2012 a *International Fungal Barcoding Consortium* recomendou formalmente o uso de sequências da região ITS para classificar os fungos. Os genes de ARNr permitem o uso de “*primers* universais” para amplificar as regiões ITS1, ITS2 ou toda a região ITS, na maior parte dos fungos. Por outro lado, a amplificação desta região é relativamente fácil mesmo em pequenas amostras de material biológico (Xu, 2016).

As regiões ITS têm uma grande importância biológica no processamento do ARNr (Korabecna, 2007). Existem duas regiões ITS (Figura 13). A ITS1 localiza-se entre os genes 18S e 5.8S, enquanto a ITS2 está situada entre os genes 5.8S e 28S (Diaz, Strausbaugh, & Dongari-Bagtzoglou, 2014). Uma vez que estas regiões ITS não fazem parte das regiões transcritas conservadas do ARN estrutural ribossomal, elas são altamente divergentes entre fungos, sendo assim possível classificá-los ao nível de espécie (Tang, Iliev, Brown, Underhill, & Funari, 2015). A região genómica que contém os genes necessários para a formação do ARN ribossomal é designada de complexo de genes ADNr e foi localizada na levedura *Saccharomyces cerevisiae* no cromossoma XII (Iwen, Hinrichs, & Rupp, 2002).

Alguns estudos amplificam apenas uma das duas regiões ou a ITS1 ou a ITS2, enquanto outros estudos preferem amplificar todo o comprimento englobando a ITS1-

5.8S- ITS2. A selecção da região a amplificar deve ser realizada de um modo cuidadoso, visto que alguns *primers* amplificam mais facilmente certas espécies, tais como *Basidiomycetes* (pelos primers ITS1 e ITS1-F) ou *Ascomycetes* (pelos primers ITS2 e ITS4) (Cui et al., 2013).



**Figura 13** – Ilustração das regiões 18S, ITS1-5.8S- ITS2 e 28S. Adaptado de Cui *et al.*, (2013).

**Tabela 4-** Bases de dados para identificação das espécies fúngicas. Adaptado de (Raja et al., 2017).

<b>Nome da base de dados</b>	<b>URL</b>	<b>Região</b>
Barcode of Life Database (BOLD)	<a href="http://www.boldsystems.org/index.php/IDS_OpenIdEngine">http://www.boldsystems.org/index.php/IDS_OpenIdEngine</a>	ITS
CBS-KNAW	<a href="http://www.cbs.knaw.nl/Collecties/BioloMICSSequences.aspx">http://www.cbs.knaw.nl/Collecties/BioloMICSSequences.aspx</a>	ITS
FUSARIUM-ID	<a href="http://isolate.fusariumdb.org">http://isolate.fusariumdb.org</a>	ITS, tef1, RPB1, RPB2, tub2
Fungal Barcoding	<a href="http://www.fungalbarcoding.org">http://www.fungalbarcoding.org</a>	ITS
Fungal MLST database Q-Bank	<a href="http://www.q-bank.eu/Fungi/">http://www.q-bank.eu/Fungi/</a>	Actina (parcial), tub2, RPB1, RPB2, tef1
ISHAM, The International Society for Human and Animal Mycology	<a href="http://its.mycologylab.org">http://its.mycologylab.org</a>	ITS
Naïve Bayesian Classifier	<a href="http://rdp.cme.msu.edu/classifier/classifier.jsp">http://rdp.cme.msu.edu/classifier/classifier.jsp</a>	28S, ITS
RefSeq Target Loci (RTL)	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/targetedloci/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/targetedloci/</a>	ITS, 18S, 28S
International Subcommision on Hypocrea and Trichoderma (ISHT) TrichoKey and TrichoBLAST (Trichoderma)	<a href="http://www.isth.info/tools/blast/">http://www.isth.info/tools/blast/</a>	ITS, tef1, RPB2
UNITE (User-friendly Nordic ITS Ectomycorrhiza Database)	<a href="https://unite.ut.ee/">https://unite.ut.ee/</a>	ITS

### 5.3.2 Análise filogenética

A análise filogenética de sequências de ADN dos fungos (sequências estas que podem ser de todo o genoma ou de pequenos fragmentos como, por exemplo a região ITS) permite classificar os fungos ao nível da espécie. Baseia-se no princípio de que todos os fungos têm uma mesma origem genética, um “pai” comum, e que ao longo da evolução todos eles divergiram, de formas diferentes e quantificáveis, desse fungo original dando origem a diferentes Filos, géneros e espécies. Este tipo de análise requiere o alinhamento das sequências obtidas com sequências de referência e a utilização de programas que primeiro identificam o modelo de evolução a que as sequências obedecem e depois reconstrói os relacionamentos evolutivos entre as diferentes sequências traçando uma árvore filogenética que espelha esses relacionamentos (Raja et al., 2017).

Há vários métodos para construção da árvore filogenética como sejam a máxima parcimónia, a junção dos vizinhos, a máxima verosimilhança e a análise Bayesiana. Os dois últimos são talvez os mais usados e os mais robustos. (Raja et al., 2017).

### 5.3.3 MTPS – *Multitag Pyrosequencing*

Nesta técnica múltiplas amostras são codificadas (“*barcoded*”) usando *primers* de amplificação marcados e depois são sequenciadas por pirosequenciação no sistema 454 (Roche). A MTPS permite um processamento paralelo de múltiplas sequências e consegue analisar um grande número de amostras em simultâneo com elevada precisão (Gillevet, 2013).

No estudo de Ghannoum *et al.* (2010) foi realizada a análise do micobioma oral utilizando este método para a região ITS1 seguido de análise filogenética das sequências (Ghannoum et al., 2010).

## 6 DIVERSIDADE DA MICOBIOTA ORAL COM BASE EM MÉTODOS MOLECULARES

### 6.1 Microbioma Oral em indivíduos saudáveis

No estudo de Ghannoum *et al.* (2010) foi realizada a análise do microbioma oral utilizando a pirosequenciação 454 Multitag da região ITS1. Foram obtidas amostras de lavado oral de 20 indivíduos saudáveis da área metropolitana de Cleveland (Ohio, EUA), trabalhadores ou estudantes da *Case Western Reserve University*, com uma dieta típica Ocidental. Destes 20 indivíduos, 10 possuíam etnia Caucasiana, 8 Asiática e 2 Afro-Americana, sendo oito do sexo feminino e 12 do sexo masculino, com idades compreendidas entre os 21 e os 60 anos. Os participantes no estudo eram não fumadores e não tinham historial de diabetes *mellitus* ou medicação ativa. Depois de realizada a extração de ADN, foi realizada a amplificação da região ITS1 recorrendo aos *primers* ITS1F e ITS2 e a pirosequenciação com a plataforma GS-FLX (Roche). As sequências foram comparadas com as existentes na base de dados *Assembling Fungal Tree of Life* (AFTOL), utilizando a interface BLAST da *Web Accessible Sequence Analysis for Biological Inference* (WASABI) e a base de dados do NCBI. Realizaram ainda uma análise PCO (*principal Coordinate*) para agrupar os resultados num conjunto de dados. Para além desta análise efetuaram uma análise filogenética (Ghannoum et al., 2010).

Foi demonstrada a existência de 74 géneros de fungos cultiváveis e 11 não-cultiváveis nas amostras de lavado oral dos 20 indivíduos saudáveis (Tabela 5). A sua distribuição encontra-se esquematizada na Figura 14. Dentro dos géneros cultiváveis, 61 eram representados por apenas uma espécie, enquanto 13 eram representados por duas a seis espécies. Os fungos não cultiváveis detectados pertenciam aos géneros/famílias, *Glomus*, *Leptosphaeriaceae*, *Ascomycete*, *Basidiomycete*, *Ectomycorrhiza*, *Endophytic*, *Glomeromycete* (Ghannoum et al., 2010).

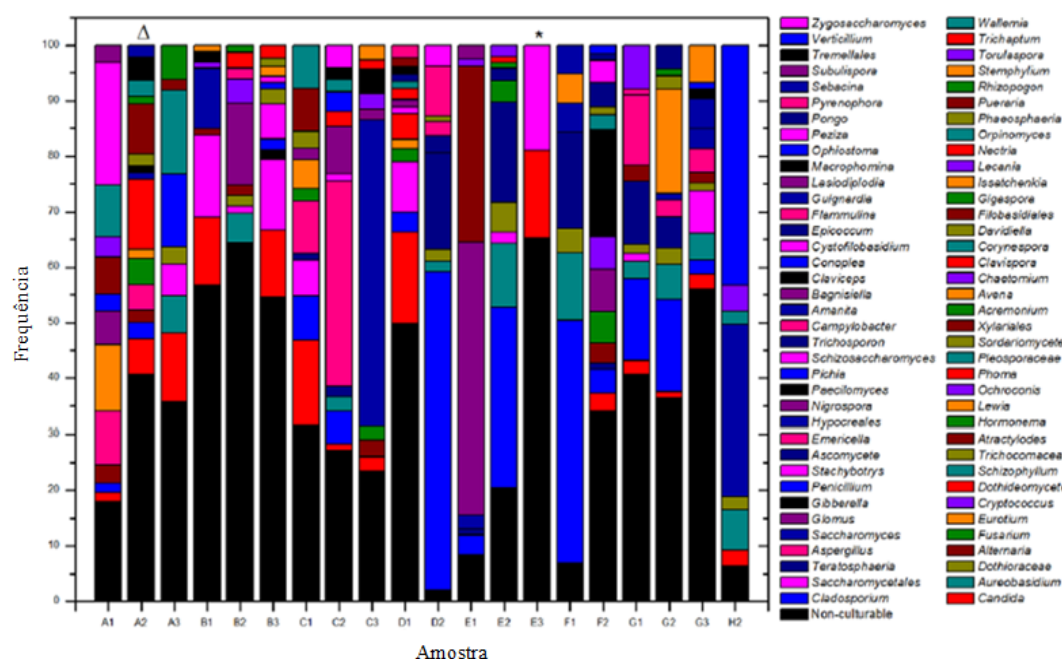
Cada indivíduo apresentou entre 9 a 23 espécies cultiváveis e tendo em conta o número total de participantes no estudo encontraram-se 101 espécies no total. Mais de 10 géneros diferentes foram encontrados em 70% (14/20 indivíduos) das amostras analisadas. Os quatro géneros presentes em 10 ou mais participantes foram *Candida* (15/20) *Cladosporium* (13/20), *Aureobasidium* (10/20), *Saccharomycetales* (10/20). Por outro lado, 36,1% dos fungos detectados foram fungos não cultiváveis (Ghannoum et al., 2010).

**Tabela 5** – Gêneros dos fungos presentes na cavidade oral nas amostras de lavado oral dos 20 indivíduos saudáveis. Adaptado de Ghannoum *et al.*, (2010).

<i>Acremonium</i>	<i>Filobasidiales</i>	<i>Fusarium</i>
<i>Alternaria</i>	<i>Flammulina</i>	<i>Gibberella</i>
<i>Amanita</i>	<i>Glomus</i>	<i>Gigaspora</i>
<i>Ascomycete</i>	<i>Guignardia</i>	<i>Pyrenophora</i>
<i>Aspergillus</i>	<i>Hormonema</i>	<i>Rhizopogon</i>
<i>Atractylodes</i>	<i>Hypocreales</i>	<i>Saccharomyces</i>
<i>Aureobasidium</i>	<i>Issatchenkia</i>	<i>Saccharomycetales</i>
<i>Avena</i>	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>Schizophyllum</i>
<i>Bagnisiella</i>	<i>Lecania</i>	<i>Schizosaccharomyces</i>
<i>Campylobacter</i>	<i>Lewia</i>	<i>Sebacina</i>
<i>Candida</i>	<i>Macrophomina</i>	<i>Sordariomycete</i>
<i>Chaetomium</i>	<i>Nectria</i>	<i>Stachybotrys</i>
<i>Cladosporium</i>	<i>Nigrospora</i>	<i>Stemphylium</i>
<i>Claviceps</i>	<i>Ochroconis</i>	<i>Subulispora</i>
<i>Clavispora</i>	<i>Ophiostoma</i>	<i>Teratosphaeria</i>
<i>Conoplea</i>	<i>Orpinomyces</i>	<i>Torulaspora</i>
<i>Corynespora</i>	<i>Paecilomyces</i>	<i>Tremellales</i>
<i>Cryptococcus</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Trichaptum</i>
<i>Cystofilobasidium</i>	<i>Peziza</i>	<i>Trichocomaceae</i>
<i>Davidiella</i>	<i>Phaeosphaeria</i>	<i>Trichosporon</i>
<i>Dothideomycete</i>	<i>Phoma</i>	<i>Verticillium</i>
<i>Dothioraceae</i>	<i>Pichia</i>	<i>Wallemia</i>
<i>Emericella</i>	<i>Pleosporaceae</i>	<i>Xylariales</i>
<i>Epicoccum</i>	<i>Pongo</i>	<i>Zygosaccharomyces</i>
<i>Eurotium</i>	<i>Pueraria</i>	Não cultiváveis

Para além da *Candida*, neste estudo observou-se a presença de *S. cerevisiae*, *Penicillium*, *Geotrichum*, *Aspergillus*, *Scopulariopsis*, *Hemispora* e *Hormodendrum* (Ghannoum et al., 2010). Estes fungos já tinham sido reportados como fazendo parte da cavidade oral de indivíduos saudáveis (Schuster, 1999).

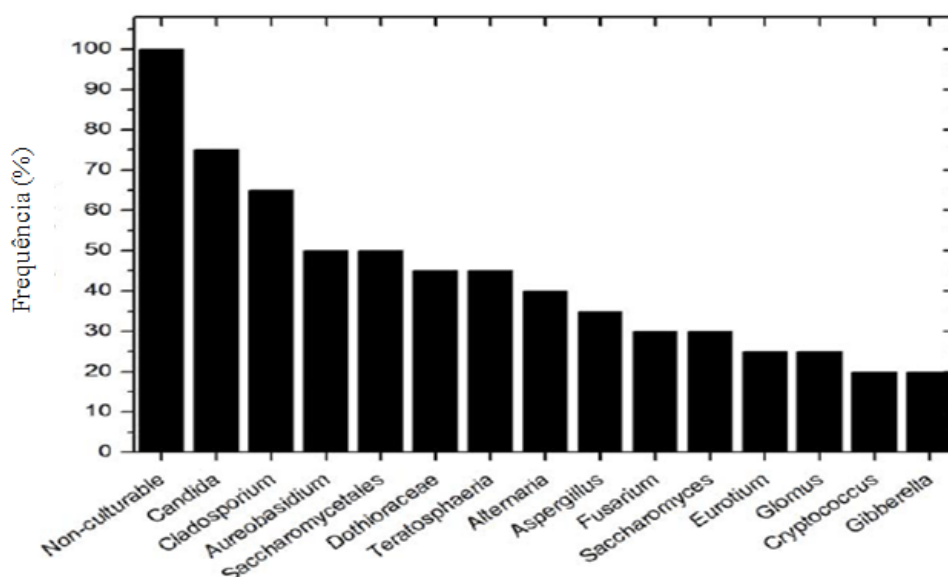




**Figura 14** - Distribuição dos fungos na cavidade oral de 20 indivíduos. (Retirado de Ghannoum *et al.* (2010). No eixo do Y, encontra-se a frequência (%) para cada amostra (eixo do X). A1, A2, A3, B1, B2, B3, C1, C2, C3, D1, D2, E1, E2, E3, F1, F2, G1, G2, G3 e H2, correspondem à identificação de cada amostra.

Para determinar a distribuição dos fungos pertencentes ao microbioma basal oral destes indivíduos saudáveis, foram identificados os fungos presentes em pelo menos 20% dos participantes. Esta análise revelou que 15 gêneros estavam presentes em  $\geq 20\%$  das amostras testadas. Estas amostras incluíam quatro dos fungos mais patogênicos – *Candida* (75%), que inclui *C. albicans* (40%), *C. parapsilosis* (15%), *C. tropicalis* (15%), *C. klmerensis* (5%), *C. metapsilosis* (5%); *Aspergillus* (35%); *Fusarium* (30%); *Cryptococcus* (20%), *Cladosporium* (65%), *Aureobasidium* (50%), *Sacharomycetales* (50%), (Figura 15).

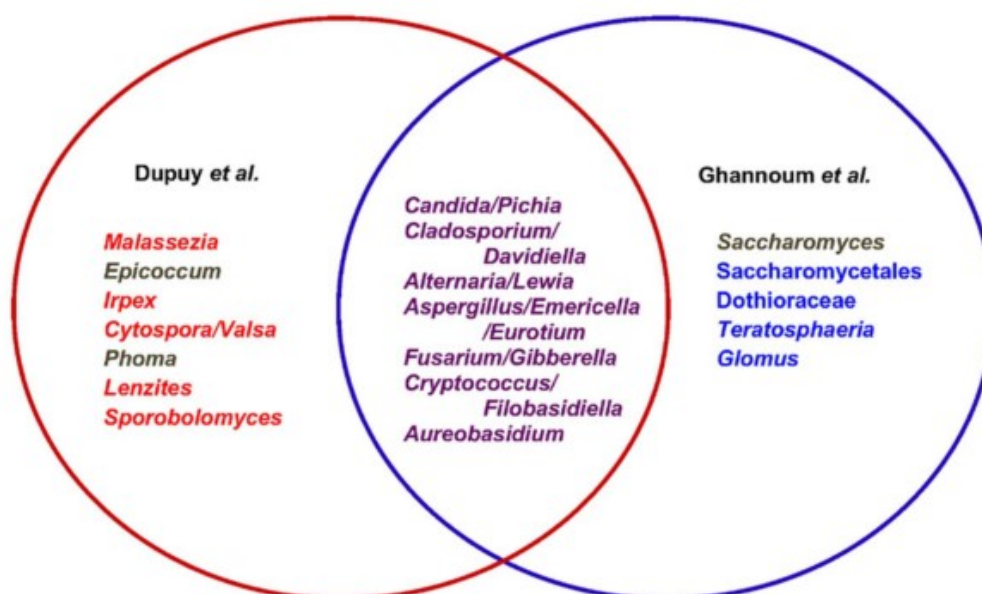
Fungos patogênicos tais como *Aspergillus*, *Fusarium* e *Cryptococcus* foram identificados pela primeira vez em, respectivamente, 35%, 30% e 20% desses indivíduos saudáveis. Os autores sugerem que nos indivíduos saudáveis estes fungos têm patogenicidade limitada devido à competição com os outros fungos do microbioma oral e devido ao sistema imunitário. No entanto esta possibilidade necessita de ser investigada em estudos longitudinais com amostras maiores (Ghannoum *et al.*, 2010)



**Figura 15** - Frequência dos gêneros de fungos presentes em  $\geq 20\%$  das amostras testadas de lavado oral de indivíduos saudáveis no estudo de Ghannoum et al., (2010). No eixo do X, estão descritos os gêneros dos fungos identificados nas amostras. No eixo do Y, a frequência (%) dos mesmos.

Em 2014, Dupuy *et al.* caracterizaram os fungos da saliva não estimulada de seis indivíduos saudáveis num estudo piloto, utilizando a pirosequenciação 454 da região ITS (Dupuy et al., 2014). Deste estudo obtiveram-se como resultados dos fungos constituintes do micobioma oral basal os gêneros sumarizados na Tabela 6. Estes resultados foram concordantes com o estudo realizado em 2010 por Ghannoum *et al.*, no que toca à identificação de *Candida*, *Pichia*, *Cladosporium/Davidiella*, *Alternaria/Lewia*, *Aspergillus/Emericella/ Eurotium*, *Fusarium/Gibberella*, *Cryptococcus/Filobasidiella* e *Aureobasidium*. Neste estudo foi identificado pela primeira vez *Malassezia* spp. como sendo um fungo comensal da cavidade oral numa quantidade relativa que variou entre 13% e 96%, o que revelou um resultado surpreendente. Para além disso, quatro dos gêneros encontrados por Ghannoum *et al.* (2010) não foram encontrados neste estudo: *Glomus*, *Teratosphaeria*, *Saccharomycetales* e *Dothioraceae*. Por outro lado, para além da *Malassezia*, este estudo identificou quatro gêneros não identificados no estudo de Ghannoum *et al.* (2010): *Irpex*, *Cytospora/Valsa*, *Lenzites/Trametes* e *Sporobolomyces/Sporidiobolus* (Figura 16). Estes quatro gêneros são agentes patogénicos comuns em plantas ou no solo e *Irpex*, *Cytospora/Valsa*, *Sporobolomyces/Sporidiobolus*, já tinham sido

identificados anteriormente como agentes causadores de doença em pacientes imunocomprometidos (Dupuy et al., 2014).

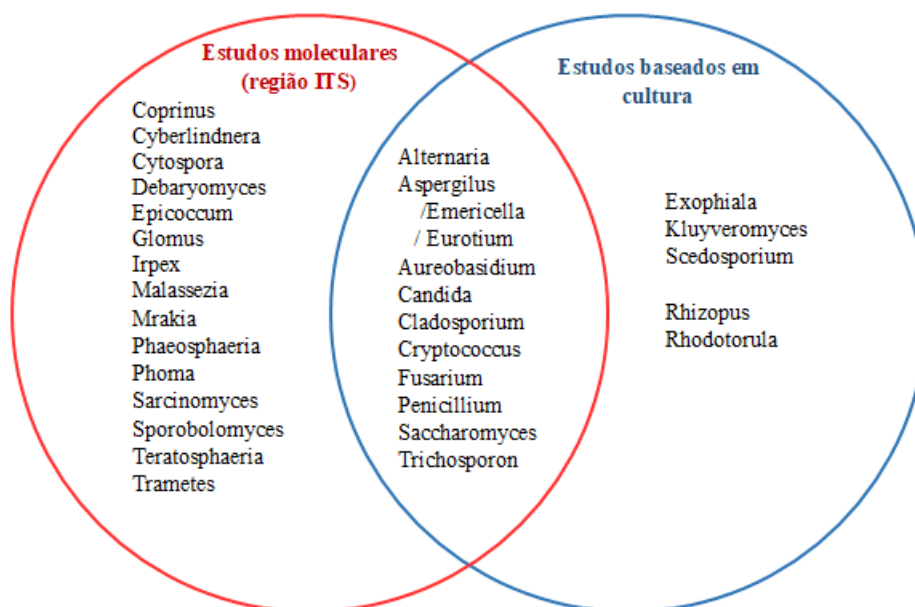


**Figura 16** – Diagrama de Venn das relações entre os dois estudos do microbioma oral de Ghannoum *et al.* (2010) (direita) e Dupuy *et al.* (2014) (esquerda). Existe uma sobreposição entre os dois estudos (a roxo, ao centro). Os géneros *Epicoccum*, *Phoma* e *Sacharomyces* foram encontrados em ambos os estudos, no entanto não foram considerados como partilhados, devido aos limites de cada estudo. Retirado de Dupuy *et al.* (2014).

**Tabela 6** – Frequência dos gêneros encontrados em pelo menos 50% dos indivíduos estudados em Dupuy *et al.* (2014).

<b>Gênero</b>	<b>Frequência</b>
Malassezia	6
Epicoccum	6
Candida/ Pichia	6
Cladosporium/ Davidiella	6
Alternaria/ Lewia	6
Não Classificado	6
Aspergillus/ Emericella/ Eurotium	6
Irpex	6
Cytospora/Valsa	6
Cryptococcus/Filo-, Cystofilobasidium	6
Phoma/Peyronellaea, Pyrenochaetopsis	6
Fusarium/Gibberella	5
Sporidiobolus / Sporobolomyces	5
Lenzites/ Trametes	5
Aureobasidium	4
Ganoderma	3
Penicillium/ Talaromyces	3
Peniphora	3
Curvularia	3
Phaeosphaeriopsis	3
Ramularia	3
Colletotrichum	3
Saccharomyces	3
Trichaptum	3
Mycosphaerella	3
Pleuroceras	3
Trichoderma	3

Em 2016, Diaz *et al.*, fez uma comparação dos constituintes do microbioma oral dos estudos realizados por Ghannoum *et al.* (2010) e Dupuy *et al.* (2014) com os estudos baseados em cultura. Na Figura 17, apresenta-se um Diagrama de Venn que ilustra esta comparação (Diaz *et al.*, 2016).



**Figura 17** - Diagrama de Venn que ilustra os gêneros de fungos identificados como constituintes do microbioma oral por métodos baseados na cultura (direita) e em métodos de sequenciação da região ITS (esquerda). Ao centro (sobreposição) encontram-se os gêneros identificados com ambos os estudos. Adaptado de Diaz *et al.*, (2016).

O estudo de Diaz *et al.* (2016) demonstrou existirem diferenças ao nível dos constituintes do microbioma oral recorrendo a uma comparação de estudos moleculares com estudos baseados na cultura.

Estas discrepâncias podem-se dever a diferenças que existiram em cada estudo analisado. Os estudos moleculares foram realizados em pacientes saudáveis enquanto os estudos cultura-dependentes foram realizados em pacientes saudáveis e não saudáveis. Com os métodos de cultura em que foram estudados indivíduos saudáveis encontraram-se *Exophiala*, *Kluyveromyces*, *Scedosporium*, enquanto que nos não saudáveis identificaram-se *Rhizopus* e *Rhodotorula* (Diaz *et al.*, 2016)

Por outro lado também houve diferença no tipo de amostra utilizada em cada estudo. O de Ghannoum *et al.* (2010) utilizou amostras de lavado oral, o de Dupuy *et al.* (2014) utilizou amostras de saliva não estimulada e os estudos baseados na cultura

utilizaram lavado oral, esfregaços de mucosas e conteúdo de canais dentários (Diaz et al., 2016).

## 6.2 Micobioma oral em indivíduos idosos

Os indivíduos com idade mais avançada são mais susceptíveis a colonização pelos fungos, devido a uma redução no fluxo salivar, nas respostas imunes e devido ao uso de próteses. O estudo de Zakaria *et al.*, (2017) investigou o micobioma oral em amostras de saliva estimulada de 410 (181 sexo masculino e 229 sexo feminino) indivíduos idosos entre os 75 e os 99 anos, da área metropolitana de Fukuoka (Japão) através de técnicas moleculares (PCR em tempo real e PCR-LH) (Zakaria et al., 2017).

O ADN fúngico foi quantificado por PCR em tempo real com recurso ao Sistema *StepOne Real Time PCR* (Applied Biosystems, USA). Foram utilizados os *primers* ITS1-F e 5.8S. A quantificação total do número de fungos foi realizada e expressa em CFU/ml amostra. As amostras das populações de fungos foram classificadas em dois grupos: o grupo com  $<10^4$  CFU/ml (84,6% dos participantes no estudo) e  $\geq 10^4$  CFU/ml de saliva (15,4% dos participantes no estudo).

Posteriormente realizou-se PCR-LH da região ITS apenas nas amostras com concentrações fúngicas  $\geq 10^4$  CFU/ml de saliva, devido aos erros existentes quando a carga fúngica é inferior a este número. Depois da amplificação da região ITS e eletroforese capilar, os resultados foram analisados com *GeneMapper Ver. 4.0* (Applied Biosystems). Os fragmentos obtidos em mais de 10 participantes no estudo ou aqueles que apareciam em mais de 10% da constituição da amostra de um participante, foram analisados. A identificação foi realizada por comparação com o estudo de White *et al.* (1990). A *C. albicans* (98,4%), *C. glabrata* (54,0%) e *C. dubliniensis* (38,1%) foram as espécies mais frequentemente encontradas. Também se identificou *C. tropicalis* (9,5%) e *Malassezia restricta* (6,3%) (Tabela 7) (Zakaria et al., 2017). Os resultados deste estudo diferem do estudo de Ghannoum *et al.* (2010): *Candida* (75%), que inclui *C. albicans* (40%), *C. parapsilosis* (15%), *C. tropicalis* (15%), *C. klmerensis* (5%), *C. metapsilosis* (5%). Estas diferenças podem dever-se a diferenças no processo de recolha de amostras e a desenhos de estudo diferentes (Zakaria et al., 2017).

O tamanho da população de fungos da cavidade oral foi significativamente associado (associação positiva) com a idade, número de dentes, utilização de prótese e taxa de fluxo salivar (Tabela 8) (Zakaria et al., 2017).

**Tabela 7** – Espécies fúngicas identificadas por PCR-LH no estudo de Zakaria *et al.* (2017).

<b>Tamanho do fragmento (base)</b>	<b>Número de indivíduos do estudo (%) *</b>	<b>Espécie correspondente ao fragmento</b>
<b>569</b>	62 (98,4%)	<i>Candida albicans</i>
<b>908</b>	34 (54%)	<i>Candida glabrata</i>
<b>573</b>	24 (38,1%)	<i>Candida dubliniensis</i>
<b>558</b>	6 (9,5%)	<i>Candida tropicalis</i>
<b>765</b>	4 (6,3%)	<i>Malassezia restricta</i>

\* Esta percentagem corresponde às espécies fúngicas dos 63 indivíduos participantes no estudo com  $\geq 10^4$  CFU/ml por amostra.

**Tabela 8-** Associação entre os fatores relacionados com estado de saúde com a carga fúngica a nível oral. Adaptado de Zakaria *et al.* (2017).

Variável	Tamanho das populações de fungos	
	<10 <sup>4</sup> CFU/ml (n =347)	≥10 <sup>4</sup> CFU/ml (n=63)
<b>Idade</b>	79	81
<b>Sexo</b>		
Masculino	155 (44,7%)	26 (41,3%)
Feminino	192 (55,3%)	37 (58,7%)
<b>Nº de dentes</b>		
≥20	134 (38,6%)	9 (14,3%)
10-19	99 (28,5%)	11 (17,5%)
1-9	69 (19,9%)	16 (25,4%)
0	45(13,0%)	27 (42,9%)
<b>Uso de prótese</b>		
Não	128 (36,9%)	6 (9,5%)
Sim	219 (63,1%)	57 (90,5%)
<b>Fluxo Salivar</b>		
Normal	259 (74,6%)	6 (9,5%)
Reduzido	88 (25,4%)	28 (44,4%)
<b>Peso abaixo do normal</b>		
Não	317 (91,4%)	53 (84,1%)
Sim	30 (8,6%)	10 (15,9%)
<b>Fumador</b>		
Nunca	201 (57,9%)	35 (55,6%)
Passado	118 (34%)	23 (36,5%)
Presente	28 (8,1%)	5 (7,9%)
<b>Diabetes</b>		
Não	262 (75,5%)	50 (79,4%)
Sim	85 (24,5%)	13 (20,6%)
<b>Medicação Anti-hipertensiva</b>		
Não	178 (51,3%)	40 (63,5%)
Sim	169 (48,7 %)	23 (36,5%)
<b>Medicação antidepressiva</b>		
Não	327 (94,2%)	58 (92,1%)
Sim	20 (5,8%)	5 (7,9%)



## 7 MICOBIOMA ORAL EM ALGUMAS DOENÇAS COM BASE EM MÉTODOS MOLECULARES

### 7.1 Micobioma oral em pacientes com VIH e SIDA

A infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (VIH) provoca o desenvolvimento de imunodeficiência progressiva, que é caracterizada por uma resposta imunológica deficiente originada pela redução do número de linfócitos T CD4<sup>+</sup>. Os indivíduos infetados com VIH têm um aumento da susceptibilidade a doenças oportunistas (como a candidíase oral). Desde o final do ano 2012 em todo o mundo existiam cerca de 34 milhões de pessoas infectadas com VIH (Taveira, Rocha, Pádua, & Jani, 2014). No ano de 2016 esse número aumentou para 36,7 milhões (UNAIDS, 2017).

Em 2007 foi realizada a identificação dos fungos presentes na cavidade oral de pacientes com VIH com base na sequenciação de amplicões (Aas *et al.* 2007). Neste estudo analisou-se a placa subgengival de 14 indivíduos VIH positivos (sexo masculino) da clínica CARE da *University of Pacific, School of Dentistry*. Estes pacientes foram classificados segundo o seu estado de doença periodontal (gingivite, periodontite e eritema gengival linear – sem perda de inserção – Tabela 9). Depois de extracção do ADN fúngico das amostras da placa subgengival, realizou-se a amplificação do ADNr da região 18S, clonagem e sequenciação. As sequências obtidas foram identificadas através de análise filogenética.

A análise do ADNr amplificado da região 18S foi efectuada num paciente com eritema gengival linear, em três pacientes severamente imunocomprometidos (cargas virais altas) com periodontite e em dois pacientes com periodontite, mas com cargas virais baixas. Nos quatro primeiros doentes apenas desse detectou *S. cerevisiae*. Nos dois pacientes VIH positivos com periodontite e cargas virais baixas detectou-se maioritariamente *Candida albicans*, sendo *S. cerevisiae* encontrado em quantidade muito diminuída (Aas et al., 2007).

**Tabela 9** – Fungos presentes na cavidade oral de pacientes com VIH Adaptado de Aas et al. (2007).

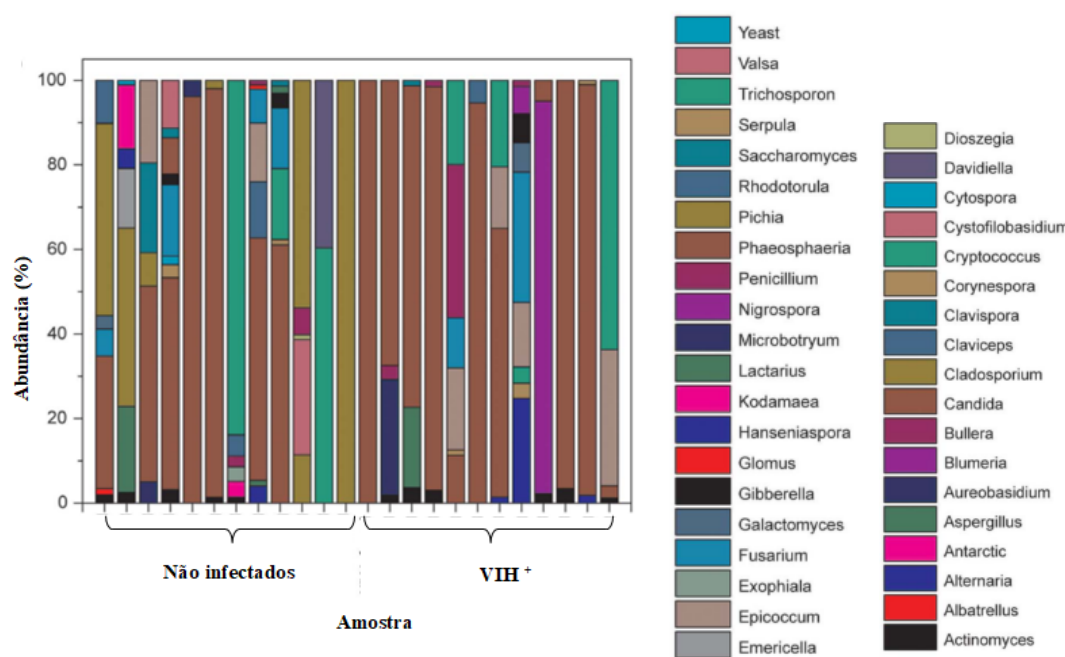
	<b>Maços de</b>					
	<b>cigarros/ano</b>	<b>IP*</b>	<b>IG*</b>	<b>HS*</b>	<b>PF*</b>	<b>NI*</b>
<b>Pacientes com ↓ carga de VIH, ↑ CD4 com Gengivite</b>	17,25	1	0	0	2,5	0,5
	0,25	1,5	1	0	2,25	0,25
	29	1	1	0,5	2	0
	3	1	1	0	2	0,75
	0	1,5	1	0	2,25	1,5
<b>Pacientes com ↑ carga de VIH, ↓ CD4 com Periodontite</b>	30	3	1,5	0,75	6	6,75
	0,75	2	1	0,25	4,5	3,75
	3	2	1	0,5	4	4,75
	5	1	1	0,5	4	3,75
<b>Pacientes com ↓ carga de VIH, ↑ CD4 com Periodontite</b>	45	2,5	1	0	5	5,75
	15	1	1,5	0,75	4,5	2,5
	2	1	1	0,5	4,5	4,25
	12,5	2,5	1,25	0,25	6,25	8
<b>Pacientes com ↓ carga de VIH, ↑ CD4 com Eritema Gengival Linear</b>	0,45	3	2,6	0,83	3,5	1,83

\* IP- Índice de Placa; IG- Índice Gengival; HS- Hemorragia à sondagem; PF - Profundidade de sondagem; NI- Nível de inserção.

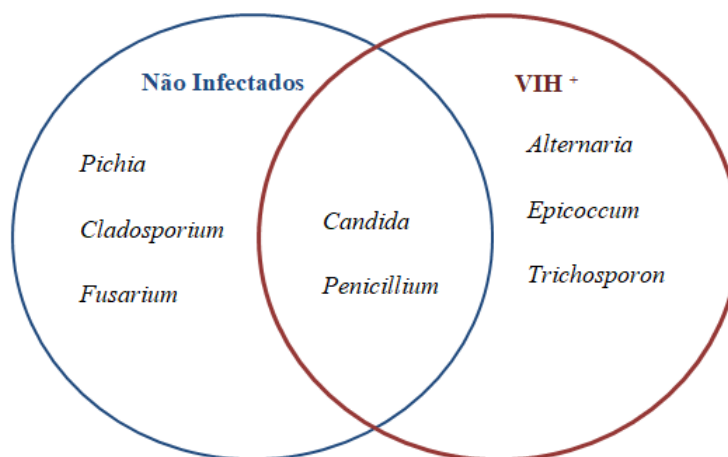
No estudo de Mukherjee *et al.*, (2014) foi utilizada a pirosequenciação para analisar as amostras de lavados salivares de 24 pacientes, 12 VIH positivos e 12 indivíduos saudáveis. Em ambos os grupos, 11 pacientes eram do sexo masculino e 1 do sexo feminino. Seis eram Afro-Americanos, dois Hispânicos e quatro Caucasianos. No grupo dos pacientes infectados com VIH as idades variavam entre 22-56 anos enquanto no grupo de participantes não infectados as idades eram entre 22-59 anos. Entre os pacientes infectados com VIH, oito estavam a fazer terapia antiretroviral. Todos os géneros identificados neste estudo encontram-se esquematizados na Figura 18.

Nos pacientes VIH positivos os géneros mais comuns encontrados foram *Candida* (92%), *Epicoccum* (33%) e *Alternaria* (25%), enquanto nos pacientes não infectados foram *Candida* (58%), *Pichia* (33%) e *Fusarium* (33%) (Figura 19). Dentro do género *Candida*, *C. albicans* foi a mais comum, 83% em VIH positivos e 58% em indivíduos não infectados, seguida pela *C. dubliniensis*, 17% em ambos os grupos. Verificou-se assim uma diferença entre os constituintes do microbioma oral entre os pacientes infectados e não infectados com VIH, assim como uma diferença com o estudo efectuado anteriormente por Aas *et al.* (2007) (Mukherjee *et al.*, 2014).

Estas duas investigações obtiveram resultados diferentes, pois as amostras analisadas pertenciam a locais da cavidade oral diferentes. No estudo de Aas *et al.* (2007) utilizaram-se amostras de placa subgengival; no de Mukherjee *et al.*, (2014) utilizaram lavados orais. Ocorreram ainda diferenças dos participantes no estudo e do seu nível de doença periodontal. Para além disso as técnicas de sequenciação utilizadas também foram diferentes. No primeiro estudo utilizaram sequenciação com inibidores terminadores de cadeia, no segundo os investigadores recorreram à pirosequenciação (Aas *et al.*, 2007; Mukherjee *et al.*, 2014)



**Figura 18** - Microbioma fúngico de pacientes VIH<sup>+</sup> e VIH<sup>-</sup> no estudo de Mukherjee *et al.*, (2014).



**Figura 19** - Fungos presentes no micobioma oral de indivíduos infectados (esquerda) e não infectados (direita) com VIH. Na interseção dos dois círculos são representados os fungos encontrados em ambos os indivíduos. Adaptado de Mukherjee *et al.*, (2014).

## 7.2 Micobioma oral em pacientes com Diabetes mellitus

A identificação de espécies para além de *Candida* em pacientes imunodeprimidos (VIH) levou a especulação de que estas espécies também poderiam estar presentes em outros grupos de pacientes imunodeprimidos, como é o caso de pacientes com diabetes *mellitus* (Willis et al., 2000). Várias espécies de *Candida* têm sido frequentemente isoladas da cavidade oral dos pacientes com diabetes *mellitus* e tem sido reportado na literatura que pelo menos 77% dos pacientes diabéticos tratados com insulina albergam na sua cavidade oral *Candida spp.* (Manfredi, McCullough, Al-Karaawi, Hurel, & Porter, 2002).

No estudo de Manfredi *et al.* (2002) foram recolhidos amostras salivares de 137 pacientes com Diabetes *mellitus* (56 com diabetes tipo 1 e 81 com diabetes tipo 2). Destes 137 pacientes, 67 eram do sexo feminino e 70 do sexo masculino, com média de idade de 58 anos (23 – 93 anos), residentes em Inglaterra e assistidos na *Diabetic Clinic* do Hospital de Middlesex (Manfredi et al., 2002).

Realizou-se a identificação por métodos fenotípicos e moleculares. Efetuaram o teste *Germ-tube* (GTT) que deu identificação positiva para *C. albicans* e *C. dubliniensis*. Extraíu-se o ADN de todas as amostras e realizou-se PCR em todos os tubos que o teste GTT deu negativo. Os *primers* do PCR foram direccionados para a região V3 do ADNr 25s e para a região ITS. Este estudo demonstrou que 83 dos 137

pacientes apresentavam alguma forma de *Candida spp.*. Desses 83 pacientes, 14 também apresentavam outras espécies não *Candida albicans*. Para além disso efectuou-se uma comparação com um grupo de controlo de 78 pacientes não diabéticos cujo resultado se encontra descrito na Tabela 10 (Manfredi et al., 2002).

**Tabela 10** – Comparação dos resultados dos pacientes diabéticos com os não diabéticos. Adaptado de Manfredi *et al.* (2002)

Espécie	Pacientes Diabéticos	Pacientes não diabéticos
<i>C. albicans</i> (total)	69/83 (83.1%)	60 /78 (76.9%)
Outras espécies	14/83 (16.8%)	18/78 (23%)

Comparando o estudo de Manfredi *et al.* (2002) com o de Willis *et al.* (2000) – que utilizou métodos de cultura e moleculares – em 414 (223 sexo masculino e 181 sexo feminino) pacientes insulino-dependentes com diabetes *mellitus* na zona de Belfast (*The Belfast City Hospital Trust* e *The Royal Group of Hospitals Trust*). O estudo de Willis *et al.* (2000) verificou que dos 318 pacientes colonizados por *Candida*, 260 (82%) apenas apresentavam uma espécie de *Candida*, sendo *C. albicans* a mais comum (201/318 – 63,2%); seguido por *C. dubliniensis* (58/318 – 18,2%) e *C. glabrata* (11/318- 3,4%) (Willis et al., 2000).

Ambos os estudos – Manfredi *et al.* (2002) e Willis *et al.* (2000) – utilizaram métodos dependentes de cultura e moleculares, no entanto no primeiro foram estudados pacientes diabéticos e não diabéticos, enquanto no segundo, os participantes eram insulino-depentes com diabetes *mellitus*. O primeiro apenas diferenciou *C. albicans*, enquanto o segundo apresentou *C. albicans*, *C. dubliniensis* e *C. glabrata*. A abundância de *C. albicans* também foi diferente em ambos os estudos. No de Manfredi *et al.* (2002) apresentou 83,1%, já no de Willis *et al.* (2000), foi uma percentagem mais reduzida (63,2%).

### 7.3 Micobioma na candidíase oral

Num estudo de Ieda *et al.* (2014) foi realizada a análise de amostras de saliva e de esfregaços da base até à ponta dos 2/3 anteriores do dorso da língua, de 52 pacientes com candidíase pseudomembranosa e de 30 pacientes saudáveis (grupo de controlo). Do grupo de 52 pacientes, cinco participantes eram do sexo masculino e 47 do sexo feminino, com uma média de idades de  $62,7 \pm 13,4$  anos, que tinham sido assistidos no Departamento de Cirurgia Oral e Maxilo-Facial do Hospital Universitário de Kyushu, no Japão, entre 2010 a 2013. Destes pacientes, 10 tinham síndrome de *Sjögren*, seis com hipertensão, dois com artrite reumatóide e um diabetes *mellitus*. Nenhum dos pacientes recebeu antibioterapia, terapia com esteróides ou imunossupressores, nos três meses anteriores ao estudo. O grupo controlo era constituído por 30 indivíduos (oito do sexo masculino e 22 do sexo feminino, com média de idades  $61,6 \pm 10,6$  anos), não fumadores, não portadores de prótese, sem sinais de xerostomia ou redução da produção de saliva. Cinco destes indivíduos tinham historial de hipertensão e três de diabetes *mellitus* (Ieda et al., 2014).

Este estudo utilizou PCR em tempo real da região ITS1 para quantificar as populações de fungos das amostras de saliva e PCR-LH para avaliar a diversidade das espécies fúngicas na região ITS. A quantidade fúngica foi calculada e expressa em CFU/ml de amostra (Ieda et al., 2014). Os dados do PCR-LH foram analisados com recurso ao *GeneMapper Ver. 4.0* (Applied Biosystems). Verificou-se, como seria de esperar, que *C. albicans* foi a espécie mais frequentemente detectada em ambos os grupos (96,2% Candidíase Pseudomembranosa, 96,7% Controlo). Contudo, *C. dubliniensis* foi encontrada em 26,9% dos pacientes com candidíase pseudomembranosa enquanto no grupo de controlo foi encontrada em 3,3% dos indivíduos. Estes resultados sugeriram que a *C. dubliniensis* poderá ser um agente etiológico da candidíase pseudomembranosa e que um aumento no número e diversidade da flora fúngica oral poderá estar envolvido na patogénese da candidíase pseudomembranosa. Para além de terem identificado *C. albicans* e *C. dubliniensis*, foram detectadas as espécies referidas na Tabela 11. Repara-se assim que do grupo de controlo para o grupo de pacientes com candidíase pseudomembranosa ocorrem mudanças ao nível das espécies encontradas. Nos pacientes controlo não foi referida a existência de *Aspergillus oryzae/flavus*, *Cladosporium cladosporioides*, *Exophiala pisciphila*, *Exophiala lecanii-corni*, *Trichosporon cutaneum*, *Candida krusei* e *Candida kefyr* no grupo de pacientes

controle, no entanto estas mesma espécies já foram identificadas no grupo de pacientes com candidíase pseudomembranosa; *Rhodotorula slooffiae*, *Debaryomyces hansenii*, *Geotrichum candium*, *Rhodotorula minuta*, *Candida lusitane*, *Saccharomyces sp*, *Penicillium coryphilum*, *Penicillium steckii* e *Malassezia cunili* verificaram um aumento do grupo de controle para o grupo com candidíase pseudomembranosa. As restantes diminuíram do grupo de controle para o grupo com candidíase (Ieda et al., 2014).

**Tabela 11** – Espécies de fúngicas detectadas em pacientes com candidíase pseudomembranosa no estudo de Ieda *et al.* (2014).

Espécies fúngicas correspondentes a cada fragmento	Número de participantes (%)	
	Candidíase Pseudomembranosa (n=52)	Controlo (n=30)
<i>Candida albicans</i>	50 (96,2%)	29 (96,7%)
<i>Rhodotorula slooffiae</i>	38 (73,1%)	19 (63,3%)
<i>Debaryomyces hansenii</i>	29 (55,8%)	12 (40%)
<i>Geotrichum candium</i>	28 (53,8%)	15 (50%)
<i>Toxicocladosporium irritans</i>	25 (48,1%)	20 (66,7%)
<i>Ceriporia lacerata</i>	19 (36,5%)	5 (16,7%)
<i>Malassezia restrita</i>	17 (32,7%)	17 (56,7%)
<i>Candida dubliniensis</i>	14 (26,9%)	1 (3,3%)
<i>Rhodotorula minuta</i>	12 (23,1%)	2 (6,7%)
<i>Aspergillus oryzae/flavus</i>	7 (13,5%)	---
<i>Candida lusitanie</i>	6 (11,5%)	3 (10%)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	6 (11,5%)	---
<i>Candida glabrata</i>	6 (11,5%)	1 (3,3%)
<i>Saccharomyces</i> sp. LM475	5 (9,6%)	1 (3,3%)
<i>Candida parapsirosis</i>	4 (7,7%)	4 (13,3%)
<i>Penicillium coryphilum</i>	4 (7,7%)	2 (6,7%)
<i>Penicillium steckii</i>	4 (7,7%)	2 (6,7%)
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	3 (5,8%)	---
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3 (5,8%)	6 (20%)
<i>Candida rugosa</i>	3 (5,8%)	6 (20%)
<i>Malassezia cunili</i>	3 (5,8%)	1 (3,3%)
<i>Candida tropicalis</i>	3 (5,8%)	2 (6,7%)
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	3 (5,8%)	---
<i>Exophiala pisciphila</i>	3 (5,8%)	---
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	2 (3,8%)	5 (16,7%)
<i>Cryptococcus neoformans</i>	1 (1,9%)	1 (3,3%)
<i>Candida guilliermondii</i>	1 (1,9%)	3 (10%)
<i>Exophiala lecanii-corni</i>	1 (1,9%)	---
<i>Trichosporon cutaneum</i>	1 (1,9%)	---
<i>Dipodascus capitatus</i>	1 (1,9%)	1 (3,3%)
<i>Candida apicola</i>	1 (1,9%)	1 (3,3%)
<i>Candida krusei</i>	1 (1,9%)	---
<i>Candida kefyr</i>	1 (1,9%)	---



Em 2016, no estudo de Imabayahi *et al.*, foi realizada a análise de lavado oral de 66 pacientes saudáveis (grupo controlo, 26 do sexo masculino e 40 do sexo feminino; média de idades  $38,7 \pm 12,6$  anos) e de 27 pacientes com candidíase pseudomembranosa (CPM) (três do sexo masculino e 24 do sexo feminino; média de idades  $64,2 \pm 14,5$  anos) que tinham sido referidos para o Departamento de Cirurgia Oral e Maxilo-Facial do Hospital Universitário de Kyushu, entre 2012 e 2015. Dos indivíduos saudáveis foram seleccionados os indivíduos não fumadores, não portadores de prótese, sem sinais clínicos de xerostomia ou de redução da produção do fluxo salivar (Imabayashi *et al.*, 2016).

Neste estudo uma parte da amostra foi cultivada em CHROMagar Candida (incubação a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 48h) e a detecção das espécies foi feita pela cor. No restante foi realizado extracção e quantificação do ADN fúngico por PCR em tempo real, sequenciação utilizando o *Ion PGM Sequencing 400 Kit* e análise taxonómica dos resultados (Imabayashi *et al.*, 2016).

Na Tabela 12, pode-se verificar as espécies fúngicas identificadas nas amostras de lavado oral. Identificou-se *C. albicans* em todos os pacientes; por outro lado *C. dubliniensis*, *C. parapsilosis*, *Wallumia sebi*, *Rhodosporidium babjevae*, *C. krusei*, *Androdiaella micra*, *Cladosporium shaerospermum* e *Sporidiobolales* foram identificados numa frequência muito mais elevada no grupo de pacientes com candidíase pseudomembranosa do que nos pacientes controlo. Pelo contrário, verificou-se existência de uma taxa muito mais elevada das espécies *Exophila equina*, *Cladosporium halotolerans* e *Agaricomycetes* no grupo controlo (Imabayashi *et al.*, 2016). Por cultura foram identificadas: *C. albicans* (100%, CPM; 100%, controlo); *C. parapsilosis* (9,7%, CPM; 0% controlo); *C. tropicalis* (12,9%, CPM –; 0%, controlo); *C. krusei* (9,7% CPM; 0%, controlo); *C. glabrata* (11,8%, CPM; 7,6%, controlo). Foi concluído que a taxa de detecção das espécies de *Candida* pelo método de cultura foi de um modo geral, semelhante aos resultados obtidos pelo método de sequenciação de nova geração. No entanto o método tradicional permite apenas a identificação das espécies mais comuns de *Candida* mas tem dificuldade em identificar as espécies fúngicas menos comuns (Imabayashi *et al.*, 2016).

**Tabela 12** - Espécies fúngicas identificadas nas amostras de lavado oral de pacientes com Candidíase Pseudomembranosa no estudo de Imabayashi *et al.*, (2016).

<b>Espécies Fúngicas</b>	<b>Controlo (n=66)</b>	<b>Candidíase Pseudomembranosa (n=27)</b>
<i>Candida albicans</i>	66 (100%)	27 (100%)
<i>Candida dubliniensis</i>	41 (62,1%)	23 (85,2%)
<i>Candida tropicalis</i>	51 (77,3%)	18 (66,7%)
<i>Trichosporon cutaneum</i>	32 (48,5%)	17 (63%)
<i>Exophiala equina</i>	55 (83,3%)	15 (55,6%)
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	32 (48,5%)	12 (44,4%)
<i>Ascomycota</i> sp	17 (25,8%)	11 (40,7%)
<i>Penicillium chermesium</i>	14 (21,2%)	11(40,7%)
<i>Candida parapsilosis</i>	9 (13,6%)	9 (33,3%)
<i>Cladosporium halotolerans</i>	39 (59,1%)	8 (29,6%)
<i>Malassezia restrita</i>	31 (47%)	7 (25,9%)
<i>Wallemia sebi</i>	6 (9,1%)	7 (25,9%)
<i>Candida krusei</i>	---	6 (22,2%)
<i>Rhodosporidium fluviale</i>	10 (15,2%)	6 (22,2%)
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	10 (15,2%)	5 (18,5%)
<i>Agaricomycetes</i> sp	31 (47%)	4 (14,8%)
<i>Eurotiales</i> sp	6 (9,1%)	4 (14,8%)
<i>Malassezia</i> sp	5 (7,6%)	4 (14,8%)
<i>Rhodosporidium babjevae</i>	1 (1,5%)	4 (14,8%)
<i>Alternaria alternata</i>	5 (7,6%)	3 (11,1%)
<i>Antrodiella micra</i>	---	3 (11,1%)
<i>Aspergillus penillioides</i>	3 (4,5%)	3 (11,1%)
<i>Aspergillus</i> sp	17 (25,8%)	3 (11,1%)
<i>Basidiomycota</i> sp	2 (3%)	3 (11,1%)
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	---	3 (11,1%)
<i>Sporidiobolales</i> sp	---	3 (11,1%)
<i>Aspergillus amstelodami</i>	---	2 (7,4%)
<i>Aspergillus vitricola</i>	---	2 (7,4%)
<i>Aureobasidium pullulans</i>	2 (3%)	2 (7,4%)
<i>Cryptococcus diffluens</i>	6 (9,1%)	2 (7,4%)
<i>Cryptococcus magnus</i>	8 (12,1%)	2 (7,4%)
<i>Debaryomyces nepalensis</i>	1 (1,5%)	2 (7,4%)
<i>Fomitopsis</i> sp	---	2 (7,4%)
<i>Herpotrichiellaceae</i> sp	3 (4,5%)	2 (7,4%)
<i>Peniophora incarnata</i>	---	2 (7,4%)
<i>Polyporaceae</i> sp	5 (7,6%)	2 (7,4%)

## 8 CONCLUSÃO

O conhecimento do microbioma oral na saúde e na doença está dependente da obtenção de uma descrição correta da comunidade na cavidade oral. Os vários métodos existentes para extrair o ADN das amostras salivares e de locais como a língua ou mucosas, seguem uma determinada metodologia e são, normalmente, seguidos de passos de amplificação por PCR para que consigam ser depois processados.

Embora os métodos de cultura ainda continuem a ser utilizados rotineiramente no laboratório de Microbiologia devido à sua praticabilidade e vantagens, os métodos moleculares têm vindo a ganhar terreno à medida que vão sendo desenvolvidas novas tecnologias que tornam estes processos mais rápidos e precisos.

Com os estudos moleculares do microbioma oral (em indivíduos saudáveis) descobriu-se que este é constituído por cerca de 74 géneros cultiváveis, 11 não cultiváveis com um total de 101 espécies, sendo *Candida*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Cryptococcus*, *Cladosporium*, *Aureobasidium*, *Sacharomicetales* os géneros mais frequentemente identificados da cavidade oral. Ainda existe alguma incerteza nestes números, pois embora os estudos sejam maioritariamente concordantes ao nível das espécies constituintes do microbioma oral, por vezes existem espécies ou géneros discrepantes, de que é um exemplo a *Malassezia*, que são identificados numa investigação e não em outras. Estas discrepâncias podem dever-se a desenhos de estudo diferentes e amostras diferentes. Muitos destes fungos já tinham sido identificados anteriormente por estudos baseados na cultura, no entanto com estas novas técnicas foram descobertos constituintes do microbioma oral que até à data ainda não se tinha conseguido identificar.

O microbioma oral tem vindo a ser estudado recorrendo a métodos moleculares em indivíduos com doenças como a diabetes *mellitus* e VIH, visto que ambos pertencem a grupos imunocomprometidos e são mais susceptíveis a doenças oportunistas, como é o caso da candidíase oral. A composição do microbioma nestes indivíduos difere do microbioma dos indivíduos saudáveis, não só em termos dos géneros e espécies identificadas, mas também na sua abundância.

O microbioma oral na candidíase pseudomembranosa também tem sido estudado com recurso a métodos moleculares. Nesta doença, muito ocorrente em pacientes imunocomprometidos (VIH e diabetes *mellitus*), também ocorre não só uma diferença ao nível das espécies/géneros encontrados, mas também uma diferença na abundância dos mesmos quando comparando com grupos de pacientes controlo (sem candidíase).

É muito importante para o Médico Dentista conhecer de forma actualizada a constituição do microbioma oral na saúde e na doença oral para fazer um diagnóstico mais preciso e efectuar de forma adequada a terapêutica das doenças orais causadas por estes microrganismos

## 9 BIBLIOGRAFIA

- Aas, J. A., Barbutto, S. M., Alpagot, T., Olsen, I., Dewhirst, F. E., & Paster, B. J. (2007). Subgingival plaque microbiota in HIV positive patients. *Journal of Clinical Periodontology*, (34), 189–195. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2006.01034.x>
- Aldhebiani, A. Y. (2017). Species concept and speciation. *Saudi Journal of Biological Sciences*. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.04.013>
- Araujo, C. R. de, Miranda, K. C., Passos, X. S., Souza, L. K. H., Lemos, J. de A., Khrais, C. H. A., ... Fernandes, O. de F. L. (2005). IDENTIFICAÇÃO DAS LEVEDURAS DO GÊNERO *Candida* POR MÉTODOS MANUAIS CONVENCIONAIS E PELO MÉTODO CROMÓGENO CHROMAGAR™ CANDIDA. *Revista de Patologia Tropical*, 34(1), 37–42.
- Baumgartner, J. C., Watts, C. M., & Xia, T. (2000). Occurrence of *Candida albicans* in infections of endodontic origin. *Journal of Endodontics*, 26(12), 695–698. <https://doi.org/10.1097/00004770-200012000-00003>
- Carvalho, M. C. da C. G. de, & Silva, D. C. G. da. (2010). Sequenciamento de DNA de nova geração e suas aplicações na genômica de plantas. *Ciência Rural*, 40(3), 735–744.
- Cui, L., Morris, A., & Ghedin, E. (2013). The human mycobiome in health and disease. *Genome Medicine*, 5(7), 63. <https://doi.org/10.1186/gm467>
- Di Bella, J. M., Bao, Y., Gloor, G. B., Burton, J. P., & Reid, G. (2013). High throughput sequencing methods and analysis for microbiome research. *Journal of Microbiological Methods*, 95(3), 401–414. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2013.08.011>
- Diaz, P. I., Hong, B.-Y., Dupuy, A. K., & Strausbaugh, L. D. (2016). Mining the oral mycobiome: Methods, components, and meaning. *Virulence*, 0(0), 1–11. <https://doi.org/10.1080/21505594.2016.1252015>
- Doud, M. S. (2010). *A multi-faceted diagnostic approach to lung infections in patients with cystic fibrosis*. Florida International University. <https://doi.org/10.25148/etd.FI10041609>
- Dupuy, A. K., David, M. S., Li, L., Heider, T. N., Peterson, J. D., Montano, E. A., ... Strausbaugh, L. D. (2014). Redefining the human oral mycobiome with improved practices in amplicon-based taxonomy: Discovery of *Malassezia* as a prominent commensal. *PLoS ONE*, 9(3), 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090899>

- Dworecka-kaszak, B., Dąbrowska, I., & Kaszak, I. (2016). The mycobiome – a friendly cross-talk between fungal colonizers and their host. *Annals of Parasitology*, 62(3), 175–184. <https://doi.org/10.17420/ap6203.51>
- El Khoury, A., Atoui, A., Rizk, T., Lteif, R., Kallassy, M., & Lebrihi, A. (2011). Differentiation between *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* from Pure Culture and Aflatoxin-Contaminated Grapes Using PCR-RFLP Analysis of aflR-aflJ Intergenic Spacer. *Journal of Food Science*, 76(4), M247–M253. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02153.x>
- Freitas, G., & Lopes, M. M. (2014). Diagnóstico Laboratorial Das Infecções Fúngicas. In A. Duarte, A. Meliço-Silvestre, C. P. Vaz, F. A. Arosa, F. M. Pereira, G. Freitas, ... V. Duque (Eds.), *Microbiologia Médica - volume 2* (1ª, pp. 309–327). Lisboa: LIDEL.
- Genes, D. N. A., Kress, W. J., & Erickson, D. L. (2008). DNA barcodes: Genes, genomics, and bioinformatics, 105(8), 2761–2762. <https://doi.org/10.1073/pnas.0800476105>
- Ghannoum, M. A., Jurevic, R. J., Mukherjee, P. K., Cui, F., Sikaroodi, M., Naqvi, A., & Gillevet, P. M. (2010). Characterization of the Oral Fungal Microbiome ( Mycobiome ) in Healthy Individuals. *PLoS Pathogens*, 6(1). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000713>
- Gillevet, P. M. (2013). Multitag sequencing ecogenomics analysis-US. Estados Unidos da América. Retrieved from <https://www.google.com/patents/US8603749>
- Göhler, A., Hetzer, A., Holtfreter, B., Geisel, M. H., Schmidt, C. O., Steinmetz, I., & Kocher, T. (2014). Quantitative molecular detection of putative periodontal pathogens in clinically healthy and periodontally diseased subjects. *PLoS ONE*, 9(7), 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099244>
- Gomes, M. B., & Martins, M. da L. (2012). *Determinação e comparação de genótipos de Candida albicans pelo método de PCR, com base nos polimorfismos da região 25S rDNA e das sequências ALT/RPS*. Universidade Nova de Lisboa - Instituto de Higiene e Medicina Tropical.
- Gonçalves, T. (2014). Princípios Gerais de Micologia: estrutura e multiplicação de fungos. In A. Duarte, A. Meliço-Silvestre, C. P. Vaz, F. A. Arosa, F. M. Pereira, G. Freitas, ... V. Duque (Eds.), *Microbiologia Médica - Volume 1* (1ª, pp. 46–51). Lisboa: LIDEL.
- Gouba, N., & Drancourt, M. (2015). Digestive tract mycobiota : A source of infection.

- Médecine et Maladies Infectieuses*, 1–8.  
<https://doi.org/10.1016/j.medmal.2015.01.007>
- Head, S., Komori, K., LaMere, S., Whisenant, T., & et al. (2014). Library construction for next-generation sequencing: Overviews and challenges. *Biotechniques*, 56(2).  
<https://doi.org/10.2144/000114133.Library>
- Huse, S. M., Huber, J. A., Morrison, H. G., Sogin, M. L., & Welch, D. M. (2007). Accuracy and quality of massively parallel DNA pyrosequencing, 8(7), 1–9.  
<https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-7-r143>
- Huseyin, C. E., O'Toole, P. W., Cotter, P. D., & Scanlan, P. D. (2017). Forgotten fungi—the gut mycobiome in human health and disease. *FEMS Microbiology Reviews*, (January), 1–33. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuw047>
- Ieda, S., Moriyama, M., Takashita, T., Maehara, T., Imabayashi, Y., Shinozaki, S., ... Nakamura, S. (2014). Molecular Analysis of Fungal Populations in Patients with Oral Candidiasis Using Internal Transcribed Spacer Region. *PLoS One*, 9(6).  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101156>
- Imabayashi, Y., Moriyama, M., Takeshita, T., Ieda, S., Hayashida, J.-N., Tanaka, A., ... Nakamura, S. (2016). Molecular analysis of fungal populations in patients with oral candidiasis using next-generation sequencing. *Nature Publishing Group*, 6(May), 1–8. <https://doi.org/10.1038/srep28110>
- Iwen, P. C., Hinrichs, S. H., & Rupp, M. E. (2002). Utilization of the internal transcribed spacer regions as molecular targets to detect and identify human fungal pathogens. *Medical Mycology*, 40(1), 87–109. <https://doi.org/10.1080/714031073>
- Korabecna, M. (2007). The Variability in the Fungal Ribosomal DNA (ITS1 ,ITS2 , and 5.8S rRNA Gene ): Its Biological Meaning and Application in Medical Mycology. In A. Méndez-Vilas (Ed.), *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology - Volume 2* (pp. 783–787). ©FORMATEx 2007.
- Kragelund, C., Reibel, J., & Pedersen, A. M. L. (2016). Oral Candidiasis and the Medically Compromised Patient. In A. M. L. Pedersen (Ed.), *Oral Infections and General Health: From Molecule to Chairside* (pp. 65–77). Springer International Publishing Switzerland 2016. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-25091-5>
- Krom, B. P., Kidwai, S., & Cate, J. M. ten. (2014). Candida and Other Fungal Species : Forgotten Players of Healthy Oral Microbiota. *Journal of Dental Reasearch*, 93(5), 445–451. <https://doi.org/10.1177/0022034514521814>

- Kutikhin, A. G., & Yuzhalin, A. E. (2015). Editorial : recent discoveries in evolutionary and genomic microbiology. *Frontiers in Microbiology*, 6(April), 1–2. <https://doi.org/10.4161/viru.28532>
- Larone, D. H. (1995). *Medically important fungi: a guide to identification* (3ª edição). Ameicanr Society for Microbiology.
- Liguori, G., Onofrio, V. Di, Lucariello, A., Signoriello, G., Colella, G., Amora, D. M., & Rossano, F. (2009). Oral candidiasis : a comparison between conventional methods and multiplex polymerase chain reaction for species identification. *Oral Microbiology And Immunology*, (24), 76–78.
- Manfredi, M., McCullough, M. J., Al-Karaawi, Z. M., Hurel, S. J., & Porter, S. R. (2002). The isolation, identification and molecular analysis of *Candida* spp. isolated from the oral cavities of patients with diabetes mellitus. *Oral Microbiology and Immunology*, 17(3), 181–185. <https://doi.org/10.1034/j.1399-302X.2002.170308.x>
- Mitra, S., Förster-Fromme, K., Damms-Machado, A., Scheurenbrand, T., Biskup, S., Huson, D. H., & Bischoff, S. C. (2013). Analysis of the intestinal microbiota using SOLiD 16S rRNA gene sequencing and SOLiD shotgun sequencing. *BMC Genomics*, 14(Suppl 5), S16. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-S5-S16>
- Mondelli, A. L., L, N.-M., Bagagli, E., Camargo, C. H., Bruder-Nascimento, A., Sugizaki, M. F., & Boas, P. J. F. V. (2012). *Candida* spp .: manual identification (reference method ) and automated identification ( Vitek system platform ). *The Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 18(3), 335–339. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1590/S1678-91992012000300011>
- Monteiro-da-Silva, F., Araujo, R., & Sampaio-Maia, B. (2014). Interindividual variability and intraindividual stability of oral fungal microbiota over time. *International Society For Human And Animal Mycology*, 52(5), 498–505. <https://doi.org/10.1093/mmy/myu027>
- Moreira, L. M., Fietto, J. L. R., & Maciel, T. E. F. (2015). Sequenciando genomas. In É. L. S. Loreto (Ed.), *Ciência genômicas: fundamentos e aplicações* (Editora Cu, pp. 27–60).
- Mukherjee, P. K., Chandra, J., Retuerto, M., Sikaroodi, M., Brown, R. E., Jurevic, R., ... Ghannoum, M. A. (2014). Oral Mycobiome Analysis of HIV-Infected Patients: Identification of *Pichia* as an Antagonist of Opportunistic Fungi. *PLoS Pathogens*, 10(3). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003996>



- Nilsson, R. H., Tedersoo, L., Abarenkov, K., Carlsen, T., Pennanen, T., & Stenlid, J. (2013). Methods Fungal community analysis by high-throughput sequencing of amplified markers – a user ' s guide, (2004). <https://doi.org/10.1111/nph.12243>
- Nonnenmann, M. W., Coronado, G., Thompson, B., Griffith, W. C., Hanson, J. D., Vesper, S., & Faustman, E. M. (2012). Utilizing pyrosequencing and quantitative PCR to characterize fungal populations among house dust samples. *Journal of Environmental Monitoring*, 14(8), 2038. <https://doi.org/10.1039/c2em30229b>
- Peters, B. A., Wu, J., Hayes, R. B., & Ahn, J. (2017). The oral fungal mycobiome: characteristics and relation to periodontitis in a pilot study. *BMC Microbiology*, 17(1), 157. <https://doi.org/10.1186/s12866-017-1064-9>
- Purty, R., & Chatterjee, S. (2016). DNA Barcoding: An Effective Technique in Molecular Taxonomy. *Austin Journal of Biotechnology & Bioengineering*, 3(1), 1–10.
- Raja, H. A., Miller, A. N., Pearce, C. J., & Oberlies, N. H. (2017). Fungal Identification Using Molecular Tools: A Primer for the Natural Products Research Community. *Journal of Natural Products*, 80(3), 756–770. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b01085>
- Ronaghi, M. (2001). Pyrosequencing Sheds Light on DNA Sequencing. *Genome Research*, 11(650), 3–11. <https://doi.org/10.1101/gr.150601.11>
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(12), 5463–5467. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>
- Schuster, G. S. (1999). Oral Flora And Pathogenic Organisms, 13(4), 757–774.
- Shokohi, T., Soteh, M. B. H., Pouri, Z. S., Hedayati, M. T., & Mayahi, S. (2010). Identification of Candida species using PCR-RFLP in cancer patients in Iran. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 28(2), 147–152. <https://doi.org/10.4103/0255-0857.62493>
- Simbolo, M., Gottardi, M., Corbo, V., Fassan, M., Mafficini, A., Malpeli, G., ... Scarpa, A. (2013). DNA Qualification Workflow for Next Generation Sequencing of Histopathological Samples. *PLoS ONE*, 8(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062692>
- Siqueira, J. F., Fouad, A. F., & Rôças, I. N. (2012). Pyrosequencing as a tool for better understanding of human microbiomes. *Journal of Oral Microbiology*, 4(10743). <https://doi.org/10.3402/jom.v4i0.10743>

- Souto, M. H., Duarte, E. R., & Brandi, I. V. (2011). Estrutura e organização celular dos micro-organismos. In E. R. Duarte (Ed.), *Microbiologia Básica para Ciências Agrárias* (pp. 35–48). Montes Claros: Instituto de Ciências Agrárias da UFMG.
- Souza, M. N., Ortiz, S. O., Mello, M. M., & Oliveira, F. D. M. (2015). Comparison between four usual methods of identification of *Candida* species. *Journal of the São Paulo Instituto of Tropical Medicine*, 57(4), 281–287.
- Stackbrandt, E., & Goebel, B. M. (1994). Taxonomic Note: A Place for DNA-DNA Reassociation and 16S rRNA Sequence Analysis in the Present Species Definition in Bacteriology. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 44(4), 846–849. <https://doi.org/10.1099/00207713-44-4-846>
- Suhr, M. J. (2015). *Characterization and Investigation of Fungi Inhabiting the Gastrointestinal Tract of Healthy and Diseased Humans*. University of Nebraska.
- Tang, J., Iliev, I. D., Brown, J., Underhill, D. M., & Funari, V. A. (2015). Mycobiome: Approaches to analysis of intestinal fungi. *Journal of Immunological Methods*, 421, 112–121. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2015.04.004>
- Taveira, N., Rocha, C., Pádua, E., & Jani, I. V. (2014). Retrovírus. In A. Duarte, A. Meliço-Silvestre, C. P. Vaz, F. A. Arosa, F. M. Pereira, G. Freitas, ... V. Duque (Eds.), *Microbiologia Médica - Volume 2* (1ª, pp. 233–235). Lisboa: LIDEL.
- Tlaskalová-Hogenová, H., Stepánková, R., Kozáková, H., Hudcovic, T., Vannucci, L., Tucková, L., ... Funda, D. P. (2011). The role of gut microbiota ( commensal bacteria ) and the mucosal barrier in the pathogenesis of inflammatory and autoimmune diseases and cancer: contribution of germ-free and gnotobiotic animal models of human diseases. *Cellular & Molecular Immunology*, 8(December), 110–120. <https://doi.org/10.1038/cmi.2010.67>
- Tonge, D. P., Pashley, C. H., & Gant, T. W. (2014). Amplicon -based metagenomic analysis of mixed fungal samples using proton release amplicon sequencing. *PLoS ONE*, 9(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093849>
- UNAIDS. (2017). Unaid Data 2017. <https://doi.org/978-92-9173-945-5>
- Viveiros, M., Couto, I., & Inácio, J. (2014). Diagnóstico Molecular. In A. Duarte, A. Meliço-Silvestre, C. P. Vaz, F. A. Arosa, F. M. Pereira, G. Freitas, ... V. Duque (Eds.), *Microbiologia Médica* (1ª, pp. 182–193). Lisboa: LIDEL.
- Vollmer, T., Störmer, M., Kleesiek, K., & Dreier, J. (2008). Evaluation of novel broad-range real-time PCR assay for rapid detection of human pathogenic fungi in

- various clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(6), 1919–1926.  
<https://doi.org/10.1128/JCM.02178-07>
- White, P. L., Williams, D. W., Kuriyama, T., Samad, S. A., Lewis, M. A. O., & Barnes, R. A. (2004). Detection of *Candida* in Concentrated Oral Rinse Cultures by Real-Time PCR. *Journal Of Clinical Microbiology*, 42(5), 2101–2107.  
<https://doi.org/10.1128/JCM.42.5.2101>
- Williams, D. W., & Lewis, M. A. O. (2000). Isolation and identification of *Candida* from the oral cavity. *Oral Diseases*, 6, 3–11.
- Willis, a M., Coulter, W. a, Sullivan, D. J., Coleman, D. C., Hayes, J. R., Bell, P. M., & Lamey, P. J. (2000). Isolation of *C. dubliniensis* from insulin-using diabetes mellitus patients. *Journal of Oral Pathology & Medicine : Official Publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*, 29(2), 86–90. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0714.2000.290206.x>
- Xu, J. (2016). Fungal DNA barcoding. *NRC Research Press*, 59(August), 913–932.
- Zakaria, M. N., Furuta, M., Takeshita, T., Shibata, Y., Sundari, R., Eshima, N., ... Yamashita, Y. (2017). Oral mycobiome in community-dwelling elderly and its relation to oral and general health conditions. *Oral Diseases*, 23(7), 973–982.  
<https://doi.org/10.1111/odi.12682>.
- Zhang, J., Hung, G., Nagamine, K., Li, B., Tsai, S., & Lo, S. (2016). Development of *Candida* -Specific Real-Time PCR Assays for the Detection and Identification of Eight Medically Important *Candida* Species. *Microbiology Insights*, 9(April), 21–28. <https://doi.org/10.4137/MBI.S38517>.TYPE